

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

昭63-501221

⑬ 公表 昭和63年(1988)5月12日

⑭ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

C 08 B 37/00

A 23 L 2/38

A 61 K 7/00

Q-6779-4C

C-7235-4B

7305-4C※

予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(3)

(全55頁)

⑮ 発明の名称 アロエ製品の製造方法、該方法によつて得られた製品およびその組成物

⑯ 特 願 昭61-503588

⑰ 翻訳文提出日 昭62(1987)2月26日

⑱ 出 願 昭61(1986)6月20日

⑲ 国際出願 PCT/US86/01335

⑳ 国際公開番号 WO87/00052

㉑ 国際公開日 昭62(1987)1月15日

優先権主張 ㉒ 1985年6月28日 ㉓ 米国(US) ㉔ 750321

⑮ 発 明 者 マツカナレイ ビル エツチ アメリカ合衆国 テキサス 75052、グランドプレーリーチョーク  
コート 4602

⑮ 出 願 人 カーリントン ラボラトリーズ アメリカ合衆国 テキサス 75247、グラス、カーペンターフリウ  
インコーポレーテッド エイ 9200

⑮ 代 理 人 弁理士 松井 光夫

⑮ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), BR, CF(広域特許), CG(広域特許), CH(広域特許), CM(広域  
特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), J  
P, LU(広域特許), ML(広域特許), MR(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), SN(広域特  
許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許)

最終頁に続く

# 請求の範囲

1. アロエ植物の葉から実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルを製造する方法において:

a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れおよびバクテリアを除去すること;

b) 前記洗浄した葉から少なくとも第1の端部を除去すること;

c) 前記切断し洗浄した葉からアントラキノンに富む液汁を排液し、保存し、採集すること; および

d) 前記葉から外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないゲルを製造することを含む方法。

2. アロエ植物の葉から実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルを製造する方法において:

a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること;

b) 洗浄したアロエの葉を砕くこと; および

c) 砕いた葉を選別して、砕いた葉の残存部分から実質的にアントラキノンを含まないゲルを化学的に取出し分離することを含む方法。

3. アロエ植物の葉から実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルを製造する方法において:

a) アロエ植物の葉を砕くこと; および

b) 砕いた葉を選別して、砕いた葉の残存部分から実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルを化学的に取り出し分離することを含む方法。

4. アロエ植物の葉から実質的にアントラキノンを含まないジュースを製造する方法において:

a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して表面の汚れおよびバクテリアを実質的に除去すること;

b) 前記洗浄した葉から第1端部と第2端部を除去すること;

c) 前記洗浄し切断した葉からアントラキノンに富む液汁を排液し、保存し、採集すること;

d) 前記葉から外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルフィレットを製造すること; および

e) 前記実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルフィレットを後述して均質化して実質的にアントラキノンを含まないアロエジュースを製造することを含む方法。

5. 前記アロエジュースを濾過して繊維性物質を除去することとをさらに含む請求の範囲第4項に従う実質的にアントラキノンを含まないアロエジュースを製造する方法。

6. 防腐剤、香料、佐剤、増体および着色剤からなる群から選ばれた少なくとも1種を前記アロエゲルフィレットもしくは前記アロエジュースに加えることを更に含む請求

水の範囲第4項に従う実質的にアントラキノンを含まないアロエジュースを製造する方法。

7. 前記防腐剤がメチルパラベン、プロピルパラベンおよびブチルパラベンからなる群から選ばれた請求の範囲第5項に従う実質的にアントラキノンを含まないアロエジュースを製造する方法。
8. 前記ジュースが照射され、凍結乾燥され、音波殺菌され、または低温殺菌されて、それにより前記ジュースが保存される請求の範囲第5項に従う実質的にアントラキノンを含まないアロエジュースを製造する方法。
9. 前記アロエジュースを限外濾過によって濾過して前記アロエジュースを浸透圧的に調節し分子量によって分類する工程を更に含む請求の範囲第5項に従う実質的にアントラキノンを含まないアロエジュースを製造する方法。
10. 請求の範囲第4項の方法によって作られた製品。
11. 請求の範囲第5項の方法によって作られた製品。
12. 請求の範囲第6項の方法によって作られた製品。
13. 請求の範囲第7項の方法によって作られた製品。
14. 請求の範囲第8項の方法によって作られた製品。
15. 請求の範囲第9項の方法によって作られた製品。
16. 前記実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルフィレットを、これを砕く前にタンブラーウォッシャー中で洗浄する工程を更に含む請求の範囲第4項に従う実質的にアントラキノンを含まないアロエジュースを製造する方法。

製造すること；

- f) このアロエジュースに水溶性低級脂肪酸極性溶媒を加えて活性化学物質を析出させ、それによって不均一溶液を形成すること；
  - g) この不均一溶液から水溶性低級脂肪酸極性溶媒と可溶化物を除去して析出した活性化学物質を単離すること；そして
  - h) この析出した活性化学物質を乾燥することを含む方法。
20. アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法において；
- a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
  - b) 洗浄したアロエの葉を砕くこと；
  - c) 砕いた葉を過剰して、砕いた葉の残存する固分から実質的にアントラキノンを含まないゲルを化学的に取り出し分離すること；
  - d) 前記実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルを挽き均質化して、可溶化物を含み実質的にアントラキノンを含まないアロエジュースを製造すること；
  - e) このアロエジュースに水溶性低級脂肪酸極性溶媒を加えて活性化学物質を析出させ、それによって不均一溶液を形成すること；
  - f) この不均一溶液から水溶性低級脂肪酸極性溶媒と可溶化物を除去して析出した活性化学物質を単離すること；

17. a) 実質的にアントラキノンを含まないアロエジュース0.1～100重量%；
- b) アラントイン0～2重量%；
- c) パンテノール0～8重量%；
- d) 佐剤または担体を含む相成物。
18. a) 実質的にアントラキノンを含まないアロエジュース0.1～100重量%；
- b) 食品用防腐剤；
- c) クエン酸；および
- d) ビタミンEを含む飲料用相成物。
19. アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法において；
- a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れおよびバクテリアを除去すること；
- b) 前記洗浄した葉から少なくとも第1の端部を除去すること；
- c) 前記切断しかつ洗浄した葉からアントラキノンに富む液汁を排液し、保存し、収束すること；
- d) 前記葉から外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないゲルフィレットを製造すること；
- e) 前記実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルフィレットを挽き均質化して、可溶化物を含み実質的にアントラキノンを含まないアロエジュースを

と；および

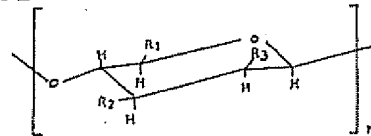
- g) この析出した活性化学物質を乾燥することを含む方法。
21. アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法において；
- a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
- b) 洗浄したアロエの葉を砕くこと；
- c) 砕いたアロエの葉を挽き均質化して可溶化物を含むアロエジュースを製造すること；
- d) このアロエジュースに水溶性低級脂肪酸極性溶媒を加えて活性化学物質を析出させ、それによって不均一溶液を形成すること；
- e) この不均一溶液から水溶性低級脂肪酸極性溶媒と可溶化物を除去して析出した活性化学物質を単離すること；そして
- f) 析出した活性化学物質を乾燥することを含む方法。
22. アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法において；
- a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的に表面の汚れおよびバクテリアを除去すること；
- b) 前記洗浄したアロエの葉を砕くこと；
- c) 砕いたアロエの葉を過剰して陰性物質を除去すること；

- d) 挽いたアロエの葉を均質化して、可溶化物を含むアントラキノンに富むアロエジュースを製造すること；
- e) このアロエジュースに水溶性低級脂肪酸極性溶媒を加えて活性化学物質を析出させ、それによって不均一溶液を形成すること；
- f) この不均一溶液から水溶性低級脂肪酸極性溶媒と可溶化物を除去して析出した活性化学物質を単離すること；そして
- g) 析出した活性化学物質を乾燥することを含む方法。
23. アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法において：
- a) アロエ植物の葉を砕いて可溶化物を含むアロエジュースを押し出すこと；
- b) このアロエジュースに水溶性低級脂肪酸極性溶媒を加えて活性化学物質を析出させ、それによって不均一溶液を形成すること；
- c) この不均一溶液から水溶性低級脂肪酸極性溶媒と可溶化物を除去して析出した活性化学物質を単離すること；そして
- d) 析出した活性化学物質を乾燥することを含む方法。
24. アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法において：
- a) アロエの葉を殺菌性溶媒で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
- b) 前記葉から外皮を除去してアロエゲルフィレットを製造すること；
- c) 前記アロエゲルフィレットを挽き均質化して、可溶化物を含むアロエジュースを製造すること；
- d) このアロエジュースに水溶性低級脂肪酸極性溶媒を加えて活性化学物質を析出させ、それによって不均一溶液を形成すること；
- e) この不均一溶液から水溶性低級脂肪酸極性溶媒と可溶化物を除去して析出した活性化学物質を単離すること；そして
- f) 析出した活性化学物質を乾燥することを含む方法。
25. 前記析出物を照射し、それによって前記活性化学物質を滅菌し、保存する請求の範囲第19項に従うアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法。
26. 4倍体積の前記水溶性低級脂肪酸極性溶媒を1倍体積のアロエジュースに加えて前記活性化学物質を析出させる請求の範囲第19項に従うアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法。
27. 前記水溶性低級脂肪酸極性溶媒がメタノール、エタノールおよびプロパノールからなる群から選ばれる請求の範囲第19項に従うアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法。
28. 前記水溶性低級脂肪酸極性溶媒がエタノールである請求の範囲第27項に従うアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法。
29. 前記水溶性低級脂肪酸極性溶媒が除去される前に前記活性化学物質が前記水溶性低級脂肪酸極性溶媒とアロエジュースから約4時間析出せしめられる請求の範囲第19項に従うアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法。
30. 前記析出した活性化学物質が凍結乾燥によって乾燥される請求の範囲第19項に従うアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法。
31. 請求の範囲第19項の方法によって製造された製品。
32. 請求の範囲第20項の方法によって製造された製品。
33. 請求の範囲第21項の方法によって製造された製品。
34. 請求の範囲第22項の方法によって製造された製品。
35. 請求の範囲第23項の方法によって製造された製品。
36. 請求の範囲第24項の方法によって製造された製品。
37. 請求の範囲第25項の方法によって製造された製品。
38. 請求の範囲第26項の方法によって製造された製品。
39. 請求の範囲第27項の方法によって製造された製品。
40. 請求の範囲第28項の方法によって製造された製品。
41. 請求の範囲第29項の方法によって製造された製品。
42. 請求の範囲第30項の方法によって製造された製品。
43. 実質的にアセチル化されたマンノースモノマーの実質的に非分解性の凍結乾燥された秩序正しい線状ポリマーを含む組成物。
44. モノマーがβ(1→4)結合によって相互に結合されている請求の範囲第43項の組成物。
45. アロエ ベラ植物のジュースのエタノール析出生成物を含む組成物において、前記析出生成物が実質的に非分解性であり、かつ凍結乾燥されている組成物。
46. 前記秩序正しい線状ポリマーがガンマ線またはマイクロ波で照射される請求の範囲第43項に従う組成物。
47. 前記秩序正しい線状ポリマーがガンマ線またはマイクロ波で照射される請求の範囲第44項に従う組成物。
48. 前記秩序正しい線状ポリマーがガンマ線またはマイクロ波で照射される請求の範囲第45項に従う組成物。
49. アロエ フェロックス植物のジュースのエタノール析出生成物を含む組成物において、前記析出生成物が実質的に非分解性であり、かつ凍結乾燥されている組成物。
50. アロエ アフリカーナ植物のジュースのエタノール析出生成物を含む組成物において、前記析出生成物が実質的に非分解性であり、かつ凍結乾燥されている組成物。
51. アフリカーナ フェロックス植物のジュースのエタノール析出生成物を含む組成物において、前記析出生成物が実質的に非分解性であり、凍結乾燥されている組成物。
52. アロエ ディコトーマ植物のジュースのエタノール析出生成物を含む組成物において、前記析出生成物が実質的に非分解性であり、凍結乾燥されている組成物。
53. アロエ ベラ植物のジュースのエタノール析出生成物が過酸化水素で酸化されている請求の範囲第45項に従う

組成物。

54. アロエ ベラ植物のジュースのエタノール析出生成物が過ヨウ素酸ナトリウムで開裂されている請求の範囲第45項に従う組成物。
55. アロエ ベラ植物のジュースのエタノール析出生成物がリン酸二水素ナトリウム水和物とリン酸水素二ナトリウム七水和物の混合物でリン酸化されている請求の範囲第45項に従う組成物。
56. アロエ ベラ植物のジュースのエタノール析出生成物が硫酸ジメチルによってメチル化されている請求の範囲第45項に従う組成物。
57. アロエ ベラ植物のジュースのエタノール析出生成物がフロム酢酸および酢酸によってカルボキシメチル化されている請求の範囲第45項に従う組成物。
58. アロエ ベラ植物のジュースのエタノール析出生成物が三酸化硫黄・トリメチルアミンコンプレックスによって硫酸化されている請求の範囲第45項に従う組成物。
59. アロエ ベラ植物のジュースのエタノール析出生成物がエピクロロヒドリンによって架橋されている請求の範囲第45項に従う組成物。
60. アロエ ベラ植物のジュースのエタノール析出生成物がホルマリンによって架橋されている請求の範囲第45項に従う組成物。
61. 下記の式で表わされる繰り返しモノマーを有する実質的に非分解性の凍結乾燥された秩序正しい線状ポリマー

を含む組成物：



上記式中  $R_1$  は、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{COO}^-$  または  $-\text{CH}_2\text{OOCCH}_3$  からなる群から選ぶことができ；  
 $R_2$  は、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OOCCH}_3$  または  $-\text{CH}_2\text{OOCCH}_3$  からなる群から選ぶことができ；  
 $R_3$  は、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OOCCH}_3$  または  $-\text{CH}_2\text{OOCCH}_3$  からなる群から選ばれることができ、そして  $n$  は 2～約 50,000 である。

年月 米国 特許

アロエ製品の製造方法、該方法によって得られた製品およびその組成物

#### 開 示 要 約

この出願は1985年12月17日に出版されたシリアル番号 810,025 号の出願の一部継続であり、810,025 号は1985年7月12日に出版されたシリアル番号754,859 号の出願の一部継続であり、754,859 号は1985年8月28日に出版されたシリアル番号750,321 号の出願の一部継続であり、750,321 号は1984年9月12日に出版されたシリアル番号 649,967 号の出願の一部継続であり、649,967 号は1982年5月7日に出版されたシリアル番号375,720 号の出願の一部継続である。前記シリアル番号810,025 号はアロエ製品の製造方法および該方法によって得られた製品という要題のものである。前記シリアル番号754,859 号、750,321 号、649,967 号および375,720 号はアロエベラ (Aloe Vera) 製品の製造方法という要題のものである。

#### 発 明 の 背 景

##### 1. 発明の分野

この発明はアロエ植物を処理し、この植物の一部を取り出して局所用ならびに内服用の組成物に処理する技術ならびにこのアロエの部分を含む組成物に関する。

##### 2. 従来技術の説明およびその他の情報

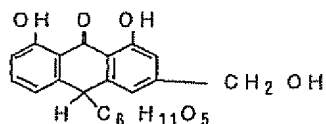
およそ325 種のアロエが知られており、その多くはアフリカ原産である。アロエバルバデンス (Aloe barbadensis) は北部アフリカ原産であり、1630年頃にバルバドス島に導入された。アロエバルバデンスの一種 [アロエ チネンシス ベイカー (Aloe chinensis Baker) と呼ばれる] はウィリアム アンダーソン (William Anderson) によって1817年に中国からクラカオ (Curaçao) に導入された。これは工業が資源として始めた19世紀中頃まで緩下剤成分のためにバルバドスで栽培された。クラカオアロエはしばしばバルバドスアロエとも呼ばれ、アルバ島およびボナール島のオランダ諸島から来ている。緩下剤アロエの市場は、より優れたより安全な緩下剤が開発されると共に消滅した。

この植物は2種類の異なるジュース物質を含んでいる。その1つは透明な細胞ゲルからつくられ、もう1つは黄色いジュースであり、外皮 (皮部) と内部繊維束との間の接合部にある繊維束の内細胞中に含まれている (第1図および第2図において1は透明細胞ゲル、2はアントラキノ類を含む黄色いジュースであり、3は外皮である)。

何世紀にも亘ってこの黄色いジュースが乾燥され緩下剤として使用されてきた。たとえば、オランダのアルバおよびボナールの島々では3月および4月に葉を切り取り、そのラテックスが調理用器中に導入されるように傾けたV型の鉢に、切断部が下向きになるように置かれる。バ

ロー・イー・タイラー, ファルマコグノシー 60~63 ページ、  
リー・アンド・フェビガー, フィラデルフィア 1981

(Varro E. Tyler, PHARMACOGNOSY pp.60 ~ 63 (Lea and Febiger, Philadelphia, 1981)). アロエバルバデンシスミラー(Hillier)またはその他のアロエの葉の乾燥ラテックスの色は、赤っぽい黒色、茶っぽい黒色ないし暗褐色とさまざまに変化する。乾燥ラテックスのそれぞれの味は吐き気を起こさせるものであり苦い。またその匂いは特徴的であり不快臭である。これは多数のアントラキノングリコシドを含んでおり、その主要な1つはバルバロイン(アロエエモディン アントロンC-70 グルコシド)と呼ばれる。この乾燥ラテックスは数世紀に亘って緩下剤として販売されてきており、普通、アロエと呼ばれる。



(土) バルバロイン

この活性緩下剤成分は、種類および生育環境条件によって量的にも質的にも変化する。例えばクラカオアロエは、ケープアロエ(Cape Aloe)と比較すると2.5 倍のアロエエモディンを含んでおり、クラカオアロエは他の種類のアロエには存在しない遊離のクリソファン酸(chrysophanic acid)を識別し得る量で含んでいる(タイラー、前掲書)。多数の会社が大量の黄色い液汁を含むアロエ製品を効能が

付けている。これは穂状花序に配列された明るい黄色い花をもっている。A. バルバデンシスは東南ヨーロッパ、北アフリカおよびマダガスカルのものである。これはイタリア、シシリー、マルタおよび特に西インドにおいて栽培されている。”

“3. アロエ フェロックス ミラー(Aloe ferox Hillier)はケープアロエを産出する3種類の南アフリカの樹のような種の1つであり、この属の最も背の高い種の1つである。(原文通り)これは長さ5~15フィート、直径4~6インチの分枝した茎をもっており、その頂部にとげのある長さ1.5~2フィートの雄先状の葉を30~50枚付けた密集したロゼットを付けている。”

“4. アロエ アフリカーナ ミル(Aloe africana Hill)は原住の(aborescent)南アフリカ種であり、単純な背の高い幹をもち、その頂部に大きな角の形をした樹を縁にもつ幾つかの三角形ないし長方形の淡青緑色の葉を付けている。これはケープ植民地の原産である。”

“5. アロエ スピカータ バイカー(A. エル バルコルヌタ ベルガー)(Aloe spicata Baker, (A. Eru var. cornuta Berger))は、熱帯南アフリカに自生する背の高い枝分れたアロエである。これは白色のしみをもつ深い光沢のある多肉質の葉と約鐘状の黄色い花からなる円錐花序をもっている。”

あると称して販売している。2種のジュースは、多くの製造業者によって使用されているジュース抽出プロセスによって相互に混合される。

下記の種類のアロエはこの乾燥され緩下剤として使用される黄色い液汁のために商業的に使用されてきている。アーサー・オーソルら、ザ・ユナイテッド・ステーツ・ディスペンサトリー・アンド・フィジシャンズ・ファルマコロジー(J.B.リッペンコット社、フィラデルフィア、1980、42~43ページ)(Arthur Osol et al., THE UNITED STATES DISPENSATORY AND PHYSICIANS' PHARMACOLOGY. (J.B. Lippencott Co., Philadelphia, 1980) pp.42-43)

“1. アロエ ペリイ バイカー(Aloe Perryi Baker).

この真のソコトリン(Socotriline)アロエは多年生植物であり、ソコトラ島の特に石灰岩地域において、標高0フィートから3,000フィートの高地に至るまで豊富に生育し、また東アフリカおよびアラビアにも見出されている。これは高さが1フィートの幹をもっており、その先端には、先端が茶褐色のとげの穂をもった密集したロゼット状の淡緑色または淡赤色の多肉葉先状の葉を付けている。”

“2. アロエ バルバデンシス ミル-(A. ベラ“L”; A. ブルガリス ラマルク)。この種はクラカオアロエの属であり、非常に短い樹のような茎をもち、堅く深いとげをもった淡青緑色の雄先状の抱き合った葉を

緩下剤としてのアロエの黄色い液汁部分の最近の状況は、グッドマン(Goodman)とギルマン(Gilman)のテキストに最もよく次のようにまとめられている。

“この黄色い液汁は、これまで他のアントラキノン類との制御された臨床比較が行われたことはないが、これらの下剤の中で最も刺激性的であるというふうに言われている。これは相当な腹痛と腎臓の充血を起こし、かつ過剰に投与すると腎炎を起こすことがある。これは米国特許に、単に製薬学上の理由のみから記載されている。活性グリコシドの混合物であるアロエとアロインの両者は捨てるべきである。”

グッドマンおよびギルマン編、ザ・ファルマコロジカル・バイシス・オブ・セラピューティクス、984 (マクミラン出版社、ニューヨーク、1975)(Goodman and Gilman, Eds., THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, at 984, (Hachilian Publishing Co., Inc. New York 1975))。

アロエは縁にギザギザの付いた鋭い先をもつ鐘の形をした葉によって特徴付けられる熱帯性または亜熱帯性の植物である。数世紀に亘ってこの植物は健康に良く、治療効果を有するものと考えられ、そのような性質についての基礎に対する明確な理解もしくは科学的な分析もないままに用いられてきている。コブル(Cobble)の米国特許第3,892,853号およびコートツ(Coats)の米国特許第4,178,372号に留意されたい。この2つの特許はアロエの

葉から粘液を抽出し温和な酸化剤( $H_2O_2$ )を加えることによって安定化されたとされる(すなわち細菌学的に安定な)アロエのジュースを製造する方法を教示している。これらの特許には黄色い液汁を除去すること、あるいは黄色い液汁の存在によるアロエジュース中の不都合な性質に関して全く言及がなされていない。実例'853特許と'372特許の両者は処理前の不都合な性質がβ「および おそらく」αグロブリン蛋白質によるとしている('853特許の3欄41~43行、'372特許の3欄42~47行)。また、アロエ植物の抽出物ならびに誘導体からさまざまな商業製品を製造する試みはさまざまな程度の成功および失敗に直面してきた。

#### 発明が向けられている問題点

アロエ植物およびその特徴についての知識がこのように欠如していたため、この植物およびその成分の処理に用いられたこれまでの方法は、前述のグッドマンとギルマンによって極下作用を有することが知られていた黄色い液汁の存在の故に所望の結果を一貫しては与えない最終生成物を与えた。例えば種々のアロエ製品の製造のための従来の慣用的な方法には、一般にアロエ植物の葉全体を粉碎(加圧ローラー)、摩砕(例えばトンプソンアロエ葉スリッターの使用)または加圧(ICX 加圧エクストルーダー)を用いてアロエベラジュース(Aloe vera Juice)をつくり、次いでこのジュースを濾過し安定化するという種々の工程を含んでいる。次に得られた溶液をその他の溶液もしくは賦質と混合し、例えば化粧品、健康食品飲料、もしくは局所用

軟膏となり得る所望の最終製品をつくっていた。

このような従来の方法の主たる欠点は、最終製品の目的とする用途に相反しているばかりでなく、多くの場合においてこれらの用途に対して有害となるような特性をアロエの葉のさまざまな成分がもっているということを隠蔽していないこと、およびこれを考慮に入れていないことである。例えば本発明のプロセスに付随して行われた研究により、アロエの葉のある成分が細胞毒性を有し、米国特許第3,892,853号、一方その他の成分が細胞の成長を刺激するということが明らかにした。他の例において、皮膚の軟膏の製造に有利に使用されているアロエの葉の成分が、飲料の製造に使用されると実際に有害となり得るということが見出された。ウィンターズら(Winters et al)は、商業的に製造されたアロエ ベラ ゲル成分が正常なヒト細胞および培養腫瘍細胞に及ぼす細胞毒性効果はこれらの商業製剤が商業的プロセスの際に導入されたレクチン様活性のレベルを変化させ、かつインビトロ吸着ならびにヒト細胞の生育を著しく混乱させる物質を含んでいることを示唆していると結論している。Id 95 ページ。ウィンターズらは本出願人に対して、彼が商業的に安定化されたアロエ製剤としてコート(Coats)から入手した材料を用いたことを報告している。

ウィンターズらは新鮮に抽出されたアロエのジュースは人の皮膚(線維芽細胞)の細胞の生育に対しては有益であるが、従来の商業的なアロエ製剤は実際に有害であり、

“対照的に、安定化されたアロエ ベラ ゲルの成分はインビトロでヒト正常細胞および腫瘍細胞に対して著しく細胞毒性がある”、ということを見出した。[H.D.ウィンターズら“アロエ抽出物がインビトロでヒト正常細胞および腫瘍細胞に及ぼす効果” ECD ボタニー (“Effects of Aloe Extract on Human Normal and Tumor Cells In Vitro”, ECD, BOTANY) 35 (1) 89~95(1981)]。

アロエベラ植物の実質的に全部の葉(もしくは少なくともその大部分)からこの葉のさまざまな特徴部分の不純な混合物もしくは複合物を含むジュースもしくは抽出物を製造する従来のプロセスを用いることによって得られた製品は必然的に、ある最終用途に対しては有用であるが、別の最終用途に対しては実際に汚染を構成するような成分を含んでいた。仮に存在するこのような汚染が有害物を構成しないとしても、少なくとも得られたジュースはある他の最終用途に対して所望の特性をもった調剤物というよりもむしろ、希釈された成分混合物を構成することになる。

さらに最近の研究により黄色い液汁はまた人の皮膚細胞に対して毒性があり、アイバンE. ダンホフら、“安定化されたアロエベラ: ヒト皮膚細胞に及ぼす影響” ドラッグ・アンド・コスメティック・インダストリー(Ivan E. Danhof et al., “Stabilized Aloe Vera: Effect on Human Skin Cells”, DRUG AND COSMETIC IND) 52~54, 105~106 (1983年8月)(本発明に対する先行技術とは認められない)、そしてそれが負傷した皮膚と接触す

るような局所用製品中では最小限とされるべきであることが示されている。黄色い液汁の多様な混合物からなる処理されたアロエベラゲル中に特異体質過敏性が示された。デビッド、M・モロー M. D. ら“アロエに対する過敏性”、ARCH デルマトール (David H. Morrow, M.D., et al., “Hypersensitivity to Aloe”, ARCH. DERMATOL.) 118, 1064-1065 (1980年9月)。黄色い液汁アロインがヒトの組織培養物に及ぼす不都合な影響は40年以上前に報告された腸管粘膜に対する炎症反応と一致している。メルビンW. グリーン“アロインの刺激効果、プレリミナリーノート”、アメリカン・ファーマシューティカル・アソシエーション(Helvin W. Green, “The Irritant Effect of Aloin Preliminary Note”, AMER. PHAR. ASSOC.) 30 188~187 (1941)。この問題はそれぞれの植物の黄色液汁(アロイン)含有量が種々でありかつ数百パーセントの範囲で変化し得るという事実によってますますひどいものとなる。E.R. ヤンスら“地方のアロエ種のアロイン含有率”(E.R. Jansz et al., “The Aloin Content of Local Aloe Species”, J. NATH. SCI. COUN. (Sri Lanka)) 9(1) 107~109(1981)。ヤンスらは特にアロイン(黄色液汁)が“極下剤として普通に使用されていた”ということを報告している。

アロエベラ植物を処理することに伴う2番目の問題は、葉の酸含有率に及ぼす暗さの影響である。野外において葉は採集され処理を持つ間積み重ねられる。底の方にあるア

ロエの葉は暗い状態に保持される。葉のある物は、処理されるまでに数日ないし数週間暗所に保持される。時間の経過で酸含有量は数倍に上昇し得る。F.R.バルチャ、長明に置く暗さがアロエベラリンの葉における酸の代謝に及ぼす影響”(F.R. Bharucha, "Effect of Prolonged Darkness on Acid Metabolism in the Leaves of Aloe Vera Linn.", SCI. AND CULT.) 22(7) 389~390 参照。これはアロエベラ製品の味および有効性に影響を及ぼす(あまりに多い酸は灼熱または皮膚に対する刺激を引き起こす)。

コートツの'372特許は、ゲル物質中の変化を最小限にするためにアロエ植物を制御された条件のもとで栽培すべきであることを教示している。しかし制御された条件のもとであってもこれらの物質は、100%以上変化し得る。処理されたアロエジュース中の変化するミネラルの含有量すなわち変化する塩の含有量は、濃度(たとえば粘度)の一貫性の欠如および健康上の理由(最終製品、例えばヘアシャンプー組成物における塩の実質的変動が大きいことによるヒリヒリする感じや刺激)のために多くの用途において最終製品の製造に有害である。アロエ製品の化学的安定性も、抽出されたアロエジュースのミネラル含有率が変ることによって影響される。抽出されたアロエジュース中の塩が多過ぎると局所用最終アロエ処方中で層分離が起こり得る。この第3番目の問題すなわち原料のアロエ植物のミネラル含有率が季節によって変化するという理由に基づくアロエ

ジュース組成物における一貫性は、ザ・サウスウェスト・インスティテュート・フォー・ナチュラル・ソースイズ(The Southwest Institute For Natural Sources)が1982年11月11日またはそのころにナショナル・アロエ・サイエンス・カウンシル(The National Aloe Science Council)に提出した刊行レポートによって発表されている。このレポートは参照することによってその全体がここに導入され、このレポートは制御された条件のものでさえ生育したリオグランデバレー(Rio Grande Valley)から採集されたアロエの葉中に見出される、変化するミネラルの濃度を示している。ナトリウムおよび塩素のイオン濃度は、採集の時期によって数百パーセントも変化する。アロエは多肉植物であり、土壌からミネラルを吸収する。雨期において、この植物はミネラルの濃度が低い雨によって水分が補給される。しかし乾期においては、野外は、はるかに高い濃度のミネラルを含む水によって灌漑される。また肥料が土壌にミネラルを補給し、ミネラル含有率に影響を与え得る。本発明は、一定の最終製品を製造するために、塩が過剰の濃度で存在する場合にはこれを透析することによってこの問題を克服した。

第4番目の問題、すなわち抽出されたアロエジュースから製造された製品の張性(tonicity)の望ましくない変化は、先に述べた初めの3つの問題に由来するものである。すなわち(1)アロエベラの葉は量および内容において変化し得る種々の黄色い液汁濃度を持つこと、(2)葉内の酸含有率

すなわちマレイン酸含有率がその葉が刈り取られた後、光にさらされた及び暗所に置かれた時間によって変化すること、および(3)ミネラルの含有量が雨量および処理すなわち肥料によって変化するものである。これらの変数は、アロエの粘度含有率のようなアロエベラゲルのすべての成分に影響を与える。この粘度の分解の速度は酸含有率によって変化する、この変化はさらに粘度ポリマーの大きさを処理の際に変化させることになる。これらの変数はすべて、抽出されたアロエベラジュースの浸透圧に影響を及ぼす。張性は皮膚への又は皮膚からの製品の水分の移動の度合を決定する。浸透圧はアロエジュースの張性に影響を及ぼし(ウィリアム F. ギャノン、レビュー・オブ・メディカル・フィジオロジー)(ラング・メディカル・パブリケーションズ・ロスアルトス、CA) (William F. Ganong, REVIEW OF MEDICAL PHYSIOLOGY (Lange Medical Publications, Los Altos, CA) 18~29, 984 (1983)、このことが使用される葉の性質によって等張性、高張性または低張性のアロエ製品をもたらす。

アロエベラに関連する第5番目の問題は、加水分解によって活性物質が分解することである。この分解は安定化されたゲルの形にある水の存在によって時間と共に起こり得る。

ヘンリー H. コブル(Henry H. Cobble) (米国特許第3,892,853号)およびビリー C. コーツ(Billy C. Coats) (米国特許第4,178,372号)が、以下の共通の特徴を供え

たアロエの葉の処理のための従来のプロセスにおいて上記の問題を指摘していないことは明らかである。

1. 彼らは触媒量の塩和な酸化剤を新鮮なアロエベラゲルに加え、これを約35℃~約80℃に加熱した。

コブル、第2欄、第65~68行

コーツ、第2欄、第13~16行

2. 触媒酸化に用いた好ましいすなわち酸化剤は過酸化水素である。

コブル、第3欄、第16~18行

コーツ、第3欄、第43~45行

3. 両者は4年~5年ものの植物を好んでいる。

コブル、第2欄、第31~33行

コーツ、第2欄、第39~40行

4. トコフェロールのような毒性のない酸化防止剤を用いて触媒酸化を抑えている。

コブル、第10欄、第8~9行

コーツ、第5欄、第28~31行

5. 彼らの塩和な酸化は、ベータ グロブリン蛋白質およびたぶんアルファ グロブリン蛋白質と思われるある種のゲル物質を完全に酸化するような時間行われている。

コブル、第3欄、第41~44行

コーツ、第3欄、第43~47行

6. ビル コーツは彼のプロセスにおいてオレンジジュースの処理のために設計された商業的に入手可能

し眼を用いている。

コート、第3図、第5～9行

7. コブルのプロセスもコートスのプロセスも黄色い液汁を採集していないしまたこれを保存してもない。
8. 黄色い液汁がこの製品を汚染するものであるとしても、開示されたプロセスはこれを取り除く手段を全く提供していない。
9. コートスのプロセスおよびコブルのプロセスによってつくられたアロエバゲルの実験室における分析は、黄色い液汁の量、ミネラルの含有量、色、味、ゲルコンシステンシーおよびオスモル濃度（張性）において数百パーセント変化する安定化されたアロエバゲルを示した。

一般にコブルとコートスのアロエバゲルプロセスはいずれも、黄色い液汁を粘性部分から分離して採集し、貯蔵し、保存するという手段を提供するものではない。従って、粘性を葉から分離する際に、黄色い液汁によって汚染される傾向がより大きい。彼らのプロセスは熱と酸化を必要とし、これはアロエバゲルの望ましい面分を好ましくない面分と同様に酸化することになる。さらに熱はゲルの分解を促進する。彼らの方法は、変化しうるミネラル含有量を調整することができないし、またアロエバゲルマトリクス分子、実質的にアセチル化されたマンナン（ゲルの加湿特性に影響を与える）を大きさによって選別し分離することができない。またこのプロセスは、成熟した4年ないし5年もの

の葉に対して最も有効である。このことは不利な条件である。というのは凍結によって成熟した葉が破壊されるからであり、そのような凍結は最近5年の間にリオグランデバレーにおいて3回起きているからである。アロエ加工工業の現在の状態において米国においては国内産の成熟した葉は現在実質的に取得不能である。

さらにこの技術分野における一つの問題は、その用途に対して有効性のあるアロエバゲルの画分もしくは化学物質が完全には同定されていないということである。例えば米国ファルマシスト(U.S. Pharmacist), 1982年8月号の37～45ページに発表されたジョン・フィッシャー(John Fisher)の論文には、“アロエラテックスとは対照的にアロエゲルは通常アントラキノングリコシドを少量以外含んでいない。しかし多数の物質がこのゲル中に同定されている。これらの物質としては単糖、多糖、タンニン、ステロイド化合物、種々の有機酸および酵素、サポニン、ビタミンおよび鉄、銅、カルシウム、マグネシウム、ナトリウム、カリウムのようなミネラルが含まれる。これらの物質のこの植物の評判のある活性に対する寄与は不明のままである。”最近このことはバークレー・メディカル・ニュースレター(Berkeley Medical Newsletter)に報告されており、また現在までのところ誰もその用途を同定し、かつその用途をアロエバゲル中の特定の成分と関連付けることはできなかった。この有効成分が何であるかを知りかつその物質を単離してその物質の処方量を定量的に役与することができるよ

うにする必要がある。例えばアスピリンは柳の樹皮から得られるが、柳の樹皮をどのくらいかめば一定量のアスピリンを摂取することになるかは誰もわからない。ところがアスピリンが柳の樹皮から抽出されればその一定量を一貫して摂取することが可能になるし、その形態のアスピリンは安定である。

アロエの葉の画分はこの分野におけるおびただしい数の刊行物の類とはなっていない。アロエの画分された部分を用いることの有用性に関連しない純粋に学問的な論文がマンダルとダス(Handal and Das)のインド人チームによって発表されている。

- (1) ガウルハリ マンダルとアマレンド ダス “アロエ バルバデンシス ミラーの葉から単離されたグルコマンナンの構造”、エルセビーヤ・サイエンティフィック・パブリッシング社、アムステルダム、1980 (Gaurhari Handal and Amalendu Das, “Structure of the Glucomannan Isolated from the Leaves of *Aloe Barbadensis* Hiller”, (Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1980)) 87 249～256 ページ

- (2) ガウルハリ マンダルとアマレンド ダス “アロエ バルバデンシス ミラーから単離されたD-ガラクトサンの構造”、エルセビーヤ・サイエンティフィック・パブリッシング社、アムステルダム、1980 (Gaurhari Handal and Amalendu Das, “Structure

of the D-Galactan Isolated from *Aloe barbadensis* Hiller”, (Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1980)) 86 247～257 ページ

- (3) ガウルハリ マンダル、リナ ゴーシュおよびアマレンド ダス、 “アロエ バルバデンシス ミラーの多糖類の特性、第Ⅲ部、酸性オリゴ糖の構造” (インディアン・ジャーナル・オブ・ケミストリー、1983年9月 (Gaurhari Handal, Rina Ghosh and Amalendu Das, “Characterisation of Polysaccharides of *Aloe Barbadensis* Hiller: Part III - Structure of an Acidic Oligosaccharide”, (Indian Journal of Chemistry, September 1983)) 22B 890～893 ページ

上記の(3)は本発明に対する先行技術とは認められない。

#### 発明の要約

本発明は一般に、精製されたアロエ製品の製造に関するものであり、さらに詳細にはアロエ植物の葉の種々の成分を分離することによるアロエ植物の改良された処理方法に関し、さらに詳細にはpH安定であり、実質的に塩の含有量が一定でありかつ所定レベルの張性を達成することができるアロエ植物の、改良された、粘性の、実質的にアントラキノンを含まない抽出物を製造する方法に関する。

本発明はまた、アロエ植物中の活性化学物質を葉全体もしくは前記改良された粘性の実質的にアントラキノンを



含まない抽出物から物理的に抽出する第2の方法に向けられている。このプロセスによれば化学物質は、さらに凍結乾燥され、かつ必要によりこれをガンマ線もしくはマイクロウェーブで照射することによって殺菌される。この形の化学物質は実質的に非分解性であり、所定量で投与することができる。

本発明はまた、上記第2のプロセスによって製造された形のアロエ植物中の活性化学物質に向けられている。この活性化学物質はアセチル化マンノースモノマーの実質的に非分解性の凍結乾燥された規則正しい粒状ポリマーであることがわかった。マンノースモノマーは好ましくは、 $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) 結合によって相互に結合されている。この活性化学物質は分析化学およびバイオアッセイの方法によって測定され、標準化され特徴付けられた。

ゲル、フィレット(細帯: fillet)、抽出物などに対して用いられる“実質的にアントラキノンを含まない”という語により、約0.05重量%未満であることを私は意味している。私の発明の粘液質の実質的にアントラキノンを含まない抽出物は、約0.001重量%未満のアントラキノンを含んでいる。“pH安定”という語により、3年の期間に亘って0.5 pH単位以内で再現し得るpHを持つ、所定の地方で生育した所定のアロエ画分およびアロエ根からの抽出物を私は意味する。“実質的に塩の含有量が含まれない”という言葉により、(所定の地方で生育した所定のアロエ画分およびアロエ根からの)抽出物が3年の期間に亘って $\pm 20$ ppm

んでいる。

- (a) 殺菌性溶液中でアロエの葉を洗浄し実質的にすべての表面の汚れおよびバクテリアを除去する工程；
- (b) この洗浄した葉から少なくとも第1の端部を除去する工程；
- (c) 前記洗浄切断した葉からアントラキノンを豊富に含む液汁を排液し、採集する工程；および、
- (d) 前記葉から外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないゲルを製造する工程。

“実質的にすべての表面の汚れおよびバクテリアを除去する”ということは、(1)残存する汚れが葉の重量の0.1重量%未満となる程度まで汚れを除去すること、および(2)残存する表面のバクテリアが葉1g当たり100個未満となるように表面バクテリアを殺すことを意味している。

この技術分野の当業者は、工程 (b)、(c) および (d) に替えて代わりに (b) 洗浄したアロエの葉を碎きそして (c) この碎いた葉を還析して好ましくない画分すなわちアントラキノン、ミネラルおよび糖を化学的に除去し、かつ外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないゲルをつくることができるということを認識するであろう。さらに好ましくは、アロエの葉もしくは植物全体は、洗浄工程を省略できる程に十分に清浄な畑から採集されることができる；ジュースは搾き、絞り出しおよび/または押出しによって抽出され、望むアロエ画分成分、例えばアントラキノンを含まない成分が本明細書に説明する還析または限外濾過を

以内で再現性のある塩含有率を示す性質を私は意味している。“所定の張性”という言葉により、3年の期間に亘って $\pm 20$ mOsmの再現性のある浸透圧をもつ所定のアロエ画分からの抽出物の張性を私は意味する。“活性化学物質”という言葉により、アロエバラのもつ傷の治癒およびその他の有益な性質に有効な物質を私は意味する。“実質的に非分解性”という言葉により、2年間に亘り分子量の減少が5%未満である物質であってかつ2年間に亘り、その生物活性を95%以上保持する物質を私は意味する。“実質的にアセチル化されたマンナン”という言葉により、部分的にもしくは実質的に完全にアセチル化されたマンノースモノマーを私は意味する。

例えば局所製品の場合には皮膚の自然の脱性外套膜 (pH 約4~約6) に適合するpH安定製品をもつことが望まれる。傷付いた皮膚の場合にはこのpHは血漿または血漿 (pH 約7.4) にさらによく似たものとすべきである。このレベルは意図される用途に基づいてそれぞれのスキンケア製品のために調整される。塩の全含有率は約100~約500 ミリオスモル (mOsm) の浸透圧を生じるようなものであるべきである。例えば抽性の皮膚は、等張性ないし高張性の溶液 (280~300 mOsm)；普通の皮膚は180~380 mOsm；乾燥皮膚は100~280 mOsmの溶液を必要とする。

さらに詳細には私の発明の方法は、アロエ植物の葉から実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルを抽出するという特性をもつものであり、この方法は以下の工程を含

用いて全ジュースから抽出される。このジュース画分はそれぞれの成分に分離され、続いて任意の望む組合せで再混合され、所望により本明細書に述べるように安定化される。

好ましくはアロエ植物の葉から実質的にアントラキノンを含まないジュースを製造する私の方法は次の工程を含んでいる：

- (a) アロエの葉を殺菌性溶液中で洗浄して実質的にすべての表面の汚れおよびバクテリアを除去する工程；
- (b) 前記洗浄した葉から第1の端部と第2の部分を除く工程；
- (c) 上記洗浄し切断した葉からアントラキノンを豊富に含む液汁を排液し、採集する工程；
- (d) 前記葉から外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルフィレット(細帯: fillet)を製造する工程；および
- (e) 前記実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルフィレットを碎き、均質化して、実質的にアントラキノンを含まないジュースを製造する工程。

さらに私の好ましいプロセスは、さらにアロエジュースもしくはアロエバラ画分を浸透圧的に調節するためあるいはアントラキノンの濃度をさらに5 ppm 未満あるいはさらに100 重量ppb 未満にさえ引下げるために限外濾過の工程を含んでいてもよい。

これらの工程は加工業者が大きな葉あるいは小さな葉あるいは1年未満の葉さえを使用することを可能にする。と

いうのは成熟した葉に見られるポリマーサイズがより小さい未成熟の葉から選別され処理されるからである。

このプロセスの利点の1つは、強度や採集方法が適切でなかったことにより使用不可能と従来は考えられていた損傷した葉を処理することができること、および望ましくない汚染物を透析によって除去することができることである。

最も好ましくは私の方法はさらに、アロエジュースを透過して懸濁物質を除去することを想定している。このような形においてアロエのジュースは内服用および外用の極めて多数の種類の製品に導入することができる。

私の発明のプロセスはさらに、好ましい実施態様として前記アロエゲルフィレットまたは前記アロエジュースまたは前記アロエバラ画分に防腐剤、香料もしくはFDAが承認した任意の添加物（一般に安全であるとされる、すなわち“GRAS” (generally recognized as safe) 添加物）からなる群から選ばれる1種または2種以上の添加物をさらに含むことができる。最も好ましくは、防腐剤は安息香酸、ソルビン酸カリウム、メチルパラベンおよびプロピルパラベンもしくは局所用または内服用としてFDAが承認したその他の添加物からなる群から選ばれる。

私の発明のジュースは所望により、照射され、凍結乾燥され、真空滅菌、殺菌または低温殺菌されることができ、それによってジュースを保存することができる。

この限外濾過（透析）工程は膜技術を含んでいる。この膜技術は切断されたアロエの葉の状態に依存して、異なっ

たポアサイズを有するフィルターの選択を可能にし、次のいかなる組合せも達成することができる：

- (1) 必要な場合にはアロエバラゲルから水と塩を分離する小さなポアサイズのフィルター（好ましくは約100ドルトン）。
- (2) 必要な場合にはアロエバラゲルから酸を分離することができる大きなポアサイズのフィルター（好ましくは約500ドルトン）。
- (3) 必要な場合にはアロエバラゲルから黄色い液汁成分を分離することができるさらに大きなポアサイズのフィルター（好ましくは約2000ドルトン）。
- (4) およびゲルマトリクスポリマーを分離し、分子量によってこれらを分離することができるさらに大きなポアサイズのフィルター（好ましくは約10,000～100,000ドルトン）。

限外濾過装置としてはロミコン 4-カラム（ロミコン社、100 カミングスパーン、ウォーバーン、MA 01801、モデル No. HF4 SSS、メンブランタイプ PH 50、30メンブランNo. H526.5-43-pm50）（Romicon 4-column (Romicon Co., 100 Cummings Park, Woburn, MA 01801, Model No. HF4 SSS, Membrane Type PH50, 30 Membrane Nos. H526.5-43-pm50)）が推奨される。

別の好ましい実施態様として、このプロセスの洗浄工程は前記フィレットを碎くのに先立ってタンブラーウォッシュャー中で実質的にアントラキノンを含まないアロエゲル

フィレットを洗浄する工程を含むことができる。

有効な皮膚の創傷用のゲルは、私の発明のプロセスによって製造することができ、好ましくは0.1～100重量%の実質的にアンシラキノンを含まないアロエジュース、0～2重量%のアラントイン、0～6重量%のパンテノール、および賦形剤もしくはキャリアを含むことができる。実施例7を参照されたい。アラントインおよび/またはパンテノールの濃度はFDAによって規制されている。ツィンマーマン、ゼ・エッセンシャル・ガイド・ツー・ノンプレスクリプション・ドラッグス（ハーバーとロウ ニューヨーク、1983）（Zimmerman, THE ESSENTIAL GUIDE TO NONPRESCRIPTION DRUGS (Harper and Row, New York, 1983)）を参照されたい。

私の発明の第2のプロセスは、アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出する方法であり、このプロセスは次の工程を含んでいる：

- (a) 殺菌性溶液中でアロエの葉を洗浄し実質的にすべての表面の汚れおよびバクテリアを除去する工程；
- (b) 前記洗浄した葉から少なくとも第1の端部を除去する工程；
- (c) 前記洗浄し切断した葉からアントラキノンを豊富に含む液汁を排液し、保存し、採集する工程；
- (d) 前記葉から外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないアロエゲルフィレットを製造する工程；
- (e) 前記実質的にアントラキノンを含まないアロエゲル

フィレットを碎き、均質化して、溶解された物質を含む実質的にアントラキノンを含まないアロエジュースを製造する工程；

- (f) このアロエジュースに水溶性の低級脂肪酸極性溶媒を加えて活性化学物質を沈殿せしめ、それによって不均一な溶液を生成せしめる工程；
- (g) 前記不均一な溶液から水溶性の低級脂肪酸極性溶媒及び溶解された物質を除去し、沈殿した活性化学物質を単離する工程；および
- (h) 沈殿した活性化学物質を乾燥する工程。

この技術分野の当業者は、工程 (b)、(c)および(d)の代わりに、(b)洗浄したアロエの葉を碎き、かつ(c)碎いた葉を透析して好ましくない画分すなわちアントラキノン、ミネラルおよび塩を化学的に除去し、かつ外皮を除去して、実質的にアントラキノンを含まないゲルを製造し、これを次に工程 (e)、(f)、(g)および(h)に付して活性化学物質を抽出することができるということを認識するであろう。

この技術分野の当業者はまた、工程 (b)、(c)、(d)および(e)に代えて、洗浄したアロエの葉を碎き、溶解された物質を含むアントラキノンに富んだアロエジュースを押し出し、次いでこのアロエジュースを工程 (f)、(g)および(h)に付して活性化学物質を抽出することができるということを認識するであろう。すべてのアントラキノン類およびすべてのイオンは水溶性であり、液状溶媒相中に残存し沈殿しないので、このプロセスによって活性化学物質がア

ントラキノン類および有害なイオンから有効に分離される。

この技術分野の当業者はまた、工程 (b)、(c)、(d) および (e) の代わりに、洗浄したアロエの葉全体を碎ぎ、繊維状物質を識別し、残存物を均質化して、溶解された物質を含むアントラキノンに富んだアロエジュースを製造することができることを認識するであろう。このアロエジュースを次に工程 (f)、(g) および (h) に付して活性化学物質を抽出することができる。活性化学物質は、上記した理由により、このプロセスによってアントラキノン類と有害なイオンから有効に分離される。

この技術分野の当業者は、アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出するさらにもう一つの方法が次の各工程を含んでいることを認識するであろう：

- (a) アロエの葉を殺菌性溶液中で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去する工程；
- (b) 前記葉から外皮を除去してアロエゲルフィレットを製造する工程；
- (c) 前記アロエゲルフィレットを碎ぎ、均質化して、溶解された物質を含むアロエジュースを製造する工程；
- (d) このアロエジュースに水溶性の低級脂肪酸極性溶媒を加えて活性化学物質を沈殿せしめ、それによって不均質溶液を形成する工程；
- (e) この不均質溶液から水溶性の低級脂肪酸溶媒と溶解された物質を除去して、沈殿した活性化学物質を単離する工程；および

始めることがわかった。しかし24時間の沈殿期間後にはかなりの量の活性化学物質が回収されるということもわかった。この技術分野の当業者は、最適な沈殿時間が周囲温度、圧力ならびに水溶性低級脂肪酸極性溶媒の性質に依存するということを認識するであろう。

上記抽出プロセスにおいて、熱は活性化学物質の加水分解や分解を助長しうるので、沈殿した活性化学物質はオーブン乾燥するよりも凍結乾燥によって乾燥することが望ましい。

上記抽出プロセスのすべてにおいて、アロエジュース中に含まれる何らかの繊維状物質（セルロース）も水溶性低級脂肪酸極性溶媒によって析出される（precipitated）が、これはこの溶媒の添加によって早期に析出し、活性化学物質より密度が低い。この繊維状物質は、活性化学物質が沈降せしめられた後、溶媒の表面に停まる。従って極めて容易にこれを取り除くことができる。この技術分野の当業者は、溶媒を添加する前に、代りにアロエジュースを濾過し繊維状物質を除去することができることを認識するであろう。

さらに好ましくは、上記プロセスのすべてにおいてアロエの葉または植物全体は、洗浄工程を省略することができる程に十分に洗浄した葉から採集される。

乾燥した析出活性成分は所望によりガンマ線またはマイクロ波を照射して前記活性化学物質を殺菌し保存することができる。

(f) 沈殿した活性化学物質を乾燥する工程。

上記のとおり、すべてのアントラキノン類およびすべてのイオンは水溶性であり、液状溶媒相中に残存し、沈殿を生じないので、このプロセスによって活性化学物質はアントラキノン類および有害なイオンから有効に分離される。

“実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去する”ということは、(1) 残存する汚れが葉の重量の0.1重量%未満となる程に汚れを除去すること、および(2) 残存する表面のバクテリアが葉1g当たり100個未満となるように表面バクテリアを殺すことを意味している。

好ましくは、アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出する上記すべてのプロセスにおいて、1容量のアロエジュースに対して4倍量の水溶性低級脂肪酸極性溶媒を加えて活性化学物質を沈殿される。好ましい水溶性低級脂肪酸極性溶媒は、メタノール、エタノールおよびプロパノールである。最も好ましい溶媒はエタノールである。この技術分野の当業者は、活性化学物質がそれから沈殿する限り、上記好ましい溶媒の代わりにその他の水溶性低級脂肪酸極性溶媒を使用することができることを認識するであろう。

上記抽出プロセスにおいて、活性化学物質が水溶性低級脂肪酸極性溶媒とアロエジュースの混合物から約4時間で放置沈降せしめられることが好ましい。この混合物を4時間で放置沈降せしめると最適な量の活性化学物質が得られること、4時間を越えると沈殿した活性化学物質が分解を

従って本発明は、アロエベラ製品の製造のための新規かつ改良された方法を提供するものである。

本発明はさらに、アロエ植物の葉の明確に特徴的な部分の望ましくない相合せまたは混合を防止するようにアロエベラ植物の葉を処理する改良された方法を提供するものである。

本発明はさらに、仕上がった抽出物中の望ましくない成分の濃度を最少にする、アロエベラ植物の葉の種々の抽出物を製造するための改良された方法を提供するものである。

本発明はまた、アロエベラ植物の葉の特定の部分又はセグメントを特徴づける或る成分の濃度を最大にし、かつその葉の他の部分又はセグメントを特徴づける或る成分を最少にし、もしくはなくすような、アロエベラ植物の葉の抽出物を製造するための新規かつ改良された方法を提供するものである。

本発明はまた、アロエベラ植物の葉の黄色い液汁の濃度が低い、アロエベラ植物の葉からの抽出物を製造するための新規かつ改良された方法を提供するものである。

私の好ましいプロセスは、先行技術に対して次のような利点をもっている：

1. 触媒量の温和な酸化剤を使用していないので、望む成分の酸化が防止される。
2. このプロセスは熱を必要としないので、室温で行うことができる。
3. 若い未成熟のあるいは損傷した葉を使用することが

できる。

4. 触媒的酸化を抑制するために抗酸化剤を使用する必要がない。
5.  $\beta$ -グロブリンおよび $\alpha$ -グロブリンが透析によって除かれる。
6. 手動および機械的な押し出し機の両者を使用することができる。
7. このプロセスは黄色い液汁を別に採集し、貯蔵し、保存することを可能にする（黄色い液汁は緩下剤としては禁止されているが、損傷されていない皮膚に対する日焼け止め剤として使用することができる。さらにこれは皮膚に褐色を付与する）。
8. 黄色い液汁がアロエベラゲル中に入り込んだ場合には、それを除去することができる。
9. その黄色い液汁の含有量、ミネラルの含有量、色、味、ゲルコンシステンシーおよび浸透性（強性）において標準化されたアロエベラゲルを提供することができる。
10. アロエベラゲルのそれぞれの成分を単離し、透析し、濃縮することによって、天然のジュース中に見出されるよりも何倍もの濃度に濃縮することができる。
11. またこの成分を分離することによって、これまで天然には存在していなかったアロエベラゲル成分の新しい組合せを得ることができる。
12. 防腐剤、香料もしくはその他のGRAS物質をあまりに

第7図は処理されたアロエ材料をさらに分離するための透析装置の好ましい使用を示す概略図を示す。

第8図～第13図は、カリシンの種々のサンプルの赤外線スペクトルを示す。

第14図はフィルムにキャスト成形された原料（raw）アロエゲルの赤外線スペクトルを示す。

第15図はカリシンの一つのサンプルの赤外線スペクトルを描。

第16～17図は、アロエゲルを葉から除去したときとアロエジュースをアルコールによって抽出したときとの間隔が1時間および10時間である場合のカリシンのサンプルの赤外線スペクトルを示す。

第18図はアルコール中にゲルが存在する時間（析出プロセス）の逆数に対してカリシンの収率をプロットしたものである。

第19図は析出する前の全プロセス時間の逆数に対してカリシンの収率をプロットしたものである。

第20図は均質化および濾過の時間の逆数に対してカリシンの収率をプロットしたものである。

第21図はアロエ フェロックス（*Aloe ferox*）からのジュースのアルコール析出生成物の赤外線スペクトルを示している。

第22図はアロエ アフリカーナ（*Aloe africana*）からのジュースのアルコール析出生成物の赤外線スペクトルを示している。

多く加え過ぎてしまった場合、そのバッチは過剰の物質を透析によって除去することにより大抵の場合救うことができる。

13. 選択されたアロエ成分を透析によって除去し、化学的に変化した後、再び添加することができる。

14. 酵素をアロエゲルに加え、反応せしめた後限外濾過によって分離することができる。

最後に本発明はアロエベラゲル中の活性化学物質を抽出する方法を提供するものである。この活性化学物質は以下で、カリシン（Carri-syn）（商標）と呼ぶこととする。上記のようにカリシンは、分析化学ならびにバイオアッセーの手法を用いて測定され標準化されたアセチル化マンノースモノマーの実質的に非分解性の凍結乾燥された規則正しい線状ポリマーであることがわかった。

#### 図面の説明

第1図および第2図は、アロエベラの葉の切取った部分を示している。

第3図は、私の方法に使用される好ましい葉洗浄装置の概略図である。

第4図はアロエベラの葉を切断し浸漬するための好ましい装置の概略図を示す。

第5図はアロエの切断物を繊断してフィレットにし、かつ粗昇する好ましい装置の概略図を示す。

第6図は繊維に均質化しかつ（所望により）濾過するための好ましい装置の概略図を示す。

第23図はアフリカーナ フェロックス（*Africana ferox*）からのジュースのアルコール析出生成物の赤外線スペクトルを示している。

第24図はアロエディコトーマ（*Aloe dichotoma*）からのジュースのアルコール析出生成物の赤外線スペクトルを示している。

第25図はセルローズの赤外線スペクトルを示している。

第26図はポリガラクトロン酸の赤外線スペクトルを示している。

第27図はコンニャク（Konjac）植物からのグルコマンナンの赤外線スペクトルを示している。

第28図はデキストランの赤外線スペクトルを示している。

第29図はグアーガムの赤外線スペクトルを示している。

第30図は局所試験による $^{51}\text{Cr}$ の放出の時間経過を示している。ヒト繊維芽細胞の培養組織を0.05%グラニュレックス（Granulex）、ヒビクレンス（Hibiclenes）、ベタジン（Betadine）またはカリシン（CDHG）により種々の時間インキュベートし、放出された全放射能のパーセントを測定した。データはそれぞれの時点における3～5回の別々の測定の平均である。対照の細胞（培地のみで処理したもの）は30分間の間に全 $^{51}\text{Cr}$ の3～5%を放出した。

第31図は細胞の損傷に対する濃度の影響を示している。培養された繊維芽細胞をヒビクレンス、グラニュレックス、ベタジンまたはカリシン（CDHG）を種々の濃度で用いて37℃で15分間インキュベートした。放出された $^{51}\text{Cr}$ の百分

率をそれぞれの濃度について測定した。対照の放出（未処理細胞からの）は1～5%の範囲であった。データは3～5回の別々の測定の平均である。

第32図はクロムの放出：CDHGおよび血清の効果を示している。細胞は、培地のみ（右下斜線付き棒）またはカリシン（0.5%）を含む培地（ハッチ付き棒）または10%牛胎児血清を含む培地（黒点付き棒）において15分間インキュベートした。ベタジン、グラニレックスまたはヒピクレンス（0.15%）を加えインキュベーションを15分間さらに継続した。データは3～4回の独立した実験の平均である。

#### 別の好ましい実施態様の詳細な説明

これらのおよびその他の目的に従って本発明のプロセスは、アロエベラの葉の特定の識別し得る部分、具体的には黄色い液汁、内部ゲルマトリクスおよび外皮が、これらの部分に特有の各々の特性をそれぞれ示すこと、ならびにある1つの識別し得る部分の特徴が特定の用途もしくは最終用途製品のための使用に助けとなり得ること、そして別の識別し得る部分の特徴がそのような用途に対して不都合であるかあるいは有害であるという発見および認識から生まれる。例えば、内部ゲルマトリクスからの抽出物は化粧品またはスキンケア製品の製造には極めて望ましい特徴をもっているが、黄色い液汁はこのような用途に対して特に有害な特性をもっているということがわかった。

さらに私は、黄色い液汁と内部ゲルマトリクスの細分部

分（sub-portions）がこれらの細分部分に特徴的な特性をもっていること、従ってそれらからの抽出物が相互に潜在的に識別し得る用途をもっていることを発見し、これを認識した。私が発見したこれらの識別し得る部分、これらの特性のいくつかのもの、および潜在的な用途のまとめは次の通りである。

部 分	組 成 部 分	用 途
黄色い液汁	(1) 比 股 物	根下剤、防ばい剤、 抗生物質剤 (antibiotic)、 殺虫剤および 日焼け止め剤
	(2) 上 澄 み 液	粘膜保護作用、 日焼け止め剤
	内 部 ゲ ル	浸透剤、低アレルギー剤 (hypoallergenic)、 保湿剤
	マトリクス	浸透剤、低アレルギー剤 (hypoallergenic)、 保湿剤
外 皮	(1) 粘 液	浸透剤、低アレルギー剤 (hypoallergenic)、 保湿剤
	(2) ゲル フィレット	浸透剤、低アレルギー剤、 創傷治癒
	(3) 間質繊維	天然防腐剤、止血剤
	(4) 残 存 マトリックス	細胞生長刺激剤
外 皮		殺虫性昆虫忌避剤、 紙パルプ繊維

上記の知識にならびに認識に基づき、かつその意図された用途に依存して最終抽出物中の望ましい成分の質および濃度を最適化するために、本発明のプロセスはアロエベラ植物の葉を特定の識別し得る部分と上記の細分部分に先ず分画すること、ならびに上記細分部分の特定成分を分離し、かつ単離することに向けられている。このようなプロセスの具体的な詳細ならびに特徴は、以下の詳細な説明からさらに容易に理解され、また認識されることになる。本発明はまた、上記プロセスによって単離される特定の成分に向けられている。

#### 分画プロセス

本発明のプロセスによって製造される抽出物は好ましくは、成熟した、戸外で生育したアロエベラ植物の外部の低い部分の葉から得られる。2年ものの植物は通常成熟している。しかし4年～5年ものの植物のより広い葉は、望まれる抽出物を一般により大量に含んでおりまた取扱もより容易である。テキサス州のリオグランデバレーに生育するアロエバルパデンシスミラーの4年～5年ものの葉は最も好ましい。これらの葉は、一般にそれぞれ約1.5～2.5ポンドの重さがある。望まれる特定の用途または製品に依存して、これらの葉は植物からそれらを切り取った直後に処理することができ、あるいはこれらは処理される前に種々の時間適当な条件下に貯蔵することができる。さらに、葉の種々の成分の濃度は、葉が受ける季節的変動および環境条件によって影響を受ける。これらはすべて、植物

の抽出物が向けられるべき特定の意図された用途に従って考慮されなければならない。

葉は、好ましくは処理に先立って葉のいかなる部分も損傷することなしに、植物の根元近くから切り取るか引き抜かれるべきである。好ましくはポケットナイフのようなインチ未満の小さなナイフを用い、茎のすぐ上の根元で葉を切り取り、置んだ細胞のゲルの露出または黄色い液汁によるゲルの汚染を防止するために茎から葉を剥ぎ取る。葉の何らかの損傷は、識別し得る部分の好ましくない混合をもたらす、従って葉の特徴的成分の好ましくない混合をもたらす。

植物から除去した後、葉は通常これを適切な洗剤の溶液（例えば我々はヨークケミカル社（テキサス州ダラス）が販売しているオリンピックプールクロール65）（OLYMPIC POOL CHLOR 65）を好む。）を用いて穏やかにこすってあるいはスプレーして洗淨することによりきれいになる。時には、このクリーニングは柔らかいブラシを用いて行う。清浄にした後、葉を清浄な水の中で十分に濯いで、洗剤残留の痕跡を除去する。

各々の葉の底の白いもしくは明るい色の部分とその先端部分は、小さな鋭いナイフを用いて注意深く切ることにより除去される。葉の間葉を実質的に構成しているこれらの部分は、別途に処理してそこから黄色い液汁を得ることができ、この黄色い液汁は上記の黄色い液汁の特性をもった成分を有する製品を製造することが望ましい用途に向けら

れる。

各々のアロエベラの葉の残存部分は次に、横に切断して短い断片、好ましくは長さが0.5インチの断片にし、各断片を高張性、等張性もしくは低張性であることができる水溶液（好ましくは脱イオン水）中に直立に置き、もって断片から黄色い液汁を排出する。あるいは、上記の特徴を有するその他の製剤に使用するために黄色い液汁を採取することが望ましい用途においてはこれらの断片を、好ましくはステンレススチール製のワイヤメッシュの底をもったステンレススチール製の、乾燥採集容器中に直立に置き、放風排液させ、そして水と接触させるために水でもって葉を還析させることができる。

このようにして断片は、約20〜30分間排液することを許される。切断した断片は最終的にシールを形成し排液を停止する。集められた黄色い液汁は次に適当な時間放置すると、2つの細分部分すなわち沈殿物と上澄みにそれぞれ分離する。黄色い液汁は無脂の皮膚（損傷されていない皮膚）に対する良好な日焼け止めをつくるのに有用であり、オリーブ色の日焼けした色をもった皮膚を与え、かつまた緩下剤の製造に有用である。

切断した葉の断片から黄色い液汁を除去する操作が完了した後、この断片を次にファイバー（すなわち家庭用チーズ）スライサーまたは剥皮ブレード（例えば剥皮ナイフ）を用いてフィレット（fillets）を形成するように皮を剥ぎ、外皮すなわち葉の断片の皮およびこの外皮のすぐ下にある

層を除去する。葉の断片を凍結してこの剥皮操作を容易にすることができる。剥皮した葉、残存しているものは内部ゲルマトリクス部分（フィレット）であり、この部分を検査し、付着している皮もしくは変色した部分を除いて残存している黄色い液汁をそこから取り去るべく指できれいにする。この黄色い液汁の残りの除去を容易にするために、穏やかな水のスプレー好ましくは脱イオン水（かつアルコールを含まない）のスプレーを用い、あるいはゲルマトリクス部分をきれいな流水に沈める。

得られたフィレット（内部ゲルマトリクス）を次に約1時間排液することができる。この排液操作の間に、通常粘液質の被膜がこのゲルマトリクスの表面に生成する。この被膜は、重力によってあるいは遠心分離のような適当な手段によって補助されて採集される。この集められた被膜は上記粘液質部分である。

ゲルマトリクスストリップの形をしたゲルマトリクスの残りを次に溜りつぶし、細断し、あるいはブレンドしてその内部に存在する間質繊維を破壊し、あるいはゲルマトリクスストリップを液化のためにワイヤメッシュまたはフィルタースクリーンを強制的に通過させることができる。この得られた物質を次に既いて均質化することができる。あるいはこのゲルマトリクスストリップを凍結し、解凍し、次に繊維と混合して液状物質を製造する（この物質は上記ゲルフィレットの細分部分を構成する）。次にこの物質を濾過して、間質繊維細分部分を得ると共に、上記残存マト

リクス細分部分を残す。要約すると、局所用途のためにこの間質繊維は内部ゲルマトリクス部分（フィレット）から除去され、一方、内服用にはこの繊維はフィレット内容物の残部と共に残される。局所用もしくは内服用のために、適当なゲル成分が例えば酪農用のミルクホモゲナイザーにより均質化して（安定剤、防腐剤、凝固剤、色素もしくはその他のGRAS添加物の添加より前に）、このゲル成分が次の操作例えばバクテリアの生育を低減させるのにより一個好都合なものにする。プロセスのこの時点で、得られた抽出物は質量スペクトル、ガスクロマトグラフィー、高圧液体クロマトグラフィーまたはその他の分析方法などの既知の品質制御手法を用いてテストされることができる。

このようにして得られた均質化された抽出物は、典型的には約4〜5のpH、好ましくは約4のpHをもっている。その安定性を大きくするために均質化された抽出物は典型的にはその最終用途に応じてクエン酸、ホウ酸、アスコルビン酸またはその他適切な物質を加えることによって中和される（例えば内服用にはクエン酸および／またはアスコルビン酸が用いられ、眼科用にはホウ酸が用いられる）。最後に、均質化された抽出物を照射、音波滅菌、制御された加熱などのこの技術分野によく知られている方法を用いて、あるいは抗菌性化学物質または静菌性化学物質、例えばGRAS-セチルアルコール、安息香酸ナトリウムまたはエチルアルコールのような化学物質をこの技術分野によく知られた量および濃度で添加することによって滅菌することが

できる。上記のものの種々の組合せを用いて本発明に従って作られた抽出物を滅菌することもできることが理解されるであろう。また種々の工業的に許容される安定化剤および添加剤が、もし必要なら、均質化されたゲル抽出物に加えることができることも理解されよう。

この時点で、最終的な品質コントロール操作を利用することができ、次に抽出物はその他の材料と共に瓶詰めもしくは配合される。内部ゲルマトリクスからの抽出物が、ここに述べたように製造される場合は、非常に低濃度の黄色い液汁を含むことになり、スキンケアおよび化粧品用途に最も適切である。

ここに述べたプロセスにおけるすべての工程は低圧室において行われる。

本発明の開示されたプロセスおよび組成物の種々の改変ならびに代替的改良、変形ならびに均等物は上記一般的な説明を読めばこの技術分野の当業者に明らかになるであろう。以下の実施例は単に例示的なものであって、このような改変、均等物もしくは変形をカバーする添付されたクレームの範囲を制限することを意図したものではない。

#### 実施例 1

安定化されたアロエゲルフィレットを調製する方法および均質化

#### A. 予備的作業：

1. 予め消毒したタンク、ミキサーおよび付属器具類を50%イソプロピルアルコール（IPA）溶液で消毒し、熱い脱

イオン水で洗いIPAを除去した。

2. ポンプおよび付属のホースを5% "HTH" 塩素水溶液で洗って洗い、次いで洗浄した。
3. このポンプと付属のホースを50%イソプロピルアルコール溶液で消毒した。ポンプと付属のホースを熱い脱イオン水を用いてIPAがなくなるまで勢よく流して洗った。
4. ホモゲナイザーと付属ホースおよびポンプを50%イソプロピルアルコール溶液で消毒した。このホモゲナイザーと付属のホースを熱い脱イオン水を用いてIPAがなくなるまで熱いよく流して洗った。

リオグランデバレーから採集したアロエ バルバデンシス ミラーの葉を収穫した後、8時間以内に40~45° Fの冷蔵トラックに移し、処理するまで40~45° Fで冷蔵して分解を少なくした。

次に貯蔵した葉20~60ポンドを窒素の次亜塩素酸カルシウムの水溶液の予備洗浄槽に入れ、実質的に葉から表面の汚れを除去しかつ葉に付いた表面のバクテリアを殺した。次亜塩素酸カルシウムの水溶液は、1ℓの水に98%次亜塩素酸カルシウムを約0.125 g加えて遊離塩素50ppmを含む溶液をつくることにより調製した。葉は、予備洗浄中に約5分間滞留させた。

次に、実質的に汚れとバクテリアを含まない葉をテキサス州ハーリンゲンのトンプソン マニュファクチャリング社 (Thompson Manufacturing Company, Harlingen, Texas)

去して、それぞれの葉の部分からアロエゲルフィレットをつくる。このアロエゲルフィレットは目で検査され、特徴的な黄色い変色によって検出される何らかの汚染されたアロエゲルフィレットもしくはフィレット部分は捨てられた。汚染されていないアロエゲルフィレットの全体の量は、葉の大きさおよび条件に依存して、初めの葉の重量の20~60%であった。

次に汚染されていないアロエゲルフィレットを、750 座席のレストラン用のステンレススチール製腐処理ユニットに入れた。このユニットはフィレットを濃厚であるがしかし自由に流動する（粗均質化）液体のコンシステンシーをもつ平均粒子サイズまで粗砕した。このステンレススチール製の腐処理ユニットはN-シンク-イレイター-デビジョン・オブ・エマーソン・エレグトリック社 (N-sink-erator Division of Emerson Electric Co., Racine, WI) 製のモデルNo. SS-150-13、シリアルNo. 115132であった。

次にこの粗砕アロエゲルフィレットをステンレススチール製保持バットに移した。この保持バットはプロセスイクイップメント社 (Process Equipment Corp. of Belding, Michigan) 製のモデルNo. 100 ガロンOVC、シリアルNo. 40865-3であった。この保持バットの中で粗砕アロエゲルフィレットを、用途および最終製品オイル対アロエ成分の比率に依存して、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、メチルパラベンまたはプロピルパラベンのようなGRAS保存剤と混合した。局所用にはメチルパラベンおよび

製のトンプソンアロエウォッシャーの水平コンベアベルトの上に乗せた。このトンプソンアロエウォッシャーは、室温の水で葉を洗浄して葉から表面の汚れ及び次亜塩素酸カルシウムの水溶液を除去した。再びこの葉を視覚的に検査し、必要により手でこすって葉の表面に残存する表面の汚れを除去した。この葉を次に室温の水で洗った。

次に先端部分および基部をそれぞれの葉から取り除き、この葉をロート状のステンレススチール製コレクターの頂部に一緒に配置した複数のステンレススチール製バスケット型コンテナの中に入れた。それぞれのコンテナはメッシュの底をもっている。黄色い液汁は、約30分間葉から排出することを許された。黄色い液汁はステンレススチールバスケットのメッシュ底を通過し、ロート状コレクターに集められた。

アロエの葉を入れているステンレススチール製バスケット型コンテナをコレクターから取り外し、次に第2のステンレススチール製容器に沈めた。この第2のステンレススチール製容器は上記のコンテナに対して向流に動く連続的に水平に流れる濯ぎ水の室温の水浴を含んでおり、前記コンテナは約30分間~1時間で前記容器の一端から多量まで手でゆっくり動かされる。このことは、黄色い液汁がさらに葉から排出することを許す。この葉は、この溶液に30分間浸漬されなければならない。

次に葉をこの溶液から取り出し、鋭いナイフまたはワイヤーチーズスライサーを用いてそれぞれの葉から外皮を剥

プロピルパラベンの混合物が推奨され、内服用には安息香酸ナトリウムと安息香酸カリウムの混合物が推奨される。例えば10%のオイルと90%のアロエ成分を用いて局所用製剤をつくる場合、プロピルパラベン対メチルパラベンの比率は1対1である。粗砕アロエゲルフィレット対保存剤の重量比は約1000対1であり、これは食品および化粧品のためのFDAのガイドラインのほぼ上限である。保持バット中の保存剤溶液は先に、GRAS保存剤の承認された量を10ガロンの脱イオン水に加えることによって調製された。

この保持バットから粗砕アロエゲルフィレット-保存剤溶液をホモゲナイザーにポンプで輸送した。ホモゲナイザーはクレパコ・フード・イクイップメント・アンド・リフリーズション社 (Illinois) 製のシリアルNo. 04-03であった。このホモゲナイザーは、ミルクの均質化のために酪農プロセスにおいて一般的に使用されているタイプのものであった。粗砕アロエゲルフィレット-保存剤溶液は、200~10,000psiの圧力で微細に均質化された。

ホモゲナイザーから微細に均質化されたアロエゲルフィレット-保存剤溶液をステンレススチール製貯蔵タンクにポンプ輸送した。この貯蔵タンクは、プロセス・イクイップメント社、(ミシガン州ベルディング) (Process Equipment Corp. of Belding, Michigan) 製のモデルNo.

1000ガロンOVC、シリアル№ 400866 - 2 であった。均質化されたアロエゲルフィレット-保存剤溶液の全重量は、出発の葉の重量の20〜60%であった。次に必要により、均質化した生成物を限外濾過を用いて還析した。

第3図〜第7図は、本発明のプロセスの好ましい実施態様をさらに詳細に開示している。具体的には第3図には、葉洗浄装置が開示されている。アロエベラの葉の洗浄装置（トンプソン・マニファクチャリング社、テキサス州、ハーリントン）（Thompson Manufacturing Company, Harlington, Texas）Aが用いられ、それによりまず葉がバット4で予備浸漬される。次に葉全体αが手でコンベアベルト8に載せられ、これによって葉は2つのブラシ9aおよび9bの下に引っ張られる。コンベアベルト8は、ハウジング5から伸びているモーターとプーリー6によって第2の端部で回転しているチェーン7により駆動される。これもトンプソンマニファクチャリング社によって提供されている。第2ブラシ9bを通過すると葉はブラッシュされ洗浄されているので、葉はコンベアベルト8の端部10において検査されそれによって葉が十分に洗浄であるかどうか目で検査され決定される。もし葉が十分にきれいでない場合には、葉はさらに洗浄するためにバット12に入れられる。もし葉が十分にきれいであるなら、葉は上方に動くコンベア8の上に載せられる。コンベア8は、それぞれ個々の葉が噴霧器11によって水道水でさらに洗浄されるためのステップ13を備えている。コンベア8は、テキサス州シー

ゴビルのダラス ミル ライト社（Dallas Mill Wright Co., of Seagoville, Texas）によって提供される。噴霧器11は、テキサス州シーゴビルのキープラミング社（Key Plumbing, Seagoville, Texas）によって提供される。ステンレススチール製のバット12は、316 ステンレススチール製であり、テキサス州ダラスのナショナルシートメタル社（National Sheet Metal Company of Dallas, Texas）による特別注文の品である。

洗浄した後、第4図に示すように葉は切断され浸漬される。コンベア8のステップ13を通して上昇した後、きれいな原料葉αは屑を除去するための穴15を備えたトレイ14の上に落下する。トレイ14はテキサス州ダラスのナショナルシートメタル社（National Sheet Metal Company of Dallas, Texas）によって提供される316 ステンレススチール製の切断浸漬装置Cの一部である。この装置は特別注文製である。トレイ14の上で、葉はその両端で手により切断され、先端と基部は穴15を通して屑入れ（示されていない）の中に捨てられる。切断した葉βは次に、ステンレススチール製のワイヤーメッシュの底を各々有するステンレススチールの多数のバスケット16のいずれか1つの中に積み重ねられる。次にこれらのバスケット16はステンレススチール製のトラックの中に置かれる。このトラックは台形のロート17の上部を形成し、このロート17によって黄色い液汁がバスケットを通して葉の底部から排液され、ロート17の底部に落下する。黄色い液汁は定期的に取り出され、貯蔵のため

に凍結される。黄色い液汁の排液の工程は約30分間かかる。

この工程の後、バスケット16の中にまだ残っている切断された葉βは、台形のロート17に最も近接した位置で水浴18に手で移される。向流の流れの中で水が台形ロート17から最も隔たった点において入口水パイプ19から浴18の中に入り、次に台形ロート17に最も近接した点で出口水パイプ20を通して排出される。トレイは台形ロート17から遠ざかる方向に水浴中を手動で徐々に動かされ、バスケットが水浴18内に停まっている洗浄工程はおよび1時間かかる。

洗浄後、バスケットは乾燥のためにトレイ21の上に置かれ、これは僅か数分間継続する。ワイヤーメッシュ、黄色い液汁の排出および自動洗浄装置を含めて、バスケットに関する第4図のアセンブリ全体はやはり、テキサス州ダラスのナショナルシートメタル社によって特注製作された316 ステンレススチール製である。

洗浄後、トレイ21の上のバスケット16の中の積み重ねた切断された葉βは、第5図に示すようにさらに切断してフィレットにするための領域に移動される。実質的に透明な材料だけが残るように、外皮22がフィレットから取り除かれる。外皮22の残部は捨てられる。次にフィレットαは粗粉砕機Dに原料供給するトラフ23の中に置かれる。このトラフ23はテキサス州ダラスのナショナルシートメタル社によってつくられた316 ステンレススチール製である。この粉砕機はモデル№ 5150 - N - シンク - イレーター（テキサス州ダラスのワトソン・フード・サービス・インダストリー

ズ社）（Watson Food Service Industries, Inc., Dallas, Texas）である。粉砕機Dによって粗粉砕した後、この粉砕機から出てくる処理された材料α'は、316 ステンレススチール製の垂直単段タンクを有するおよそ100 ガロンの容量をもつ可動タンクE（テキサス州ダラスのバントーン社を通して販売されているベルマ・サン、マニファクチャ）（Perma-San, Manufacture, distributed through Van Tone, Inc., Dallas, Texas）を通る。粗粉フィレットα'はベルマ・サン攪拌機（モデル№ AAPH2）（これもテキサス州ダラスのバントーン社から販売されている）によってタンクE内で攪拌される。

粗均質化の後、タンクEからの物質は微細均一化および（任意的な）濾過のための別途の領域に送られる。第6図においてタンクEからの材料は、オハイオ州クリーブランドのリライアンス エレクトリック社のリライアンスモータ モデル№ B76Q2139H - VF（Reliance Motor Model № B76Q2139H - VF of the Reliance Electric Company, Cleveland, Ohio）によって駆動されるポンプ26（テキサス州ダラスのクレパコ（Crepaco, Inc., Dallas, Texas）によって販売されているステンレススチール製の遠心ポンプモデル№ 4V - 81によって微細ホモゲナイザーF（テキサス州ダラスのクレパコ社モデル№ 30013）にポンプ輸送される。微細均質化の後、この材料は316 ステンレススチール製の大きな1000ガロン垂直単段混合タンクG（テキサス州ダラスのバントーン社に供給されているベルマ・サン製）に送



られる。微細に粉砕されたフィレットΔはベルマ・サン攪拌機26a（テキサス州ダラスのバントーン社から供給されているベルマ・サン製のモデルNo.AAP112）によって攪拌される。タンクG中の材料Δは、香料および適当な保存剤が添加された後に、直接に人が消費するための飲料製品のための加工に直接送ることができる。あるいはまたタンクG中の材料は、これを取り出して、排気ライン28を通るバルブの除去のためのフィルター27bを備えた1ユニットを形成するポンプ27aに送られることができる。ポンプ27aとフィルター27bはロマート珪藻土フィルター（テキサス州ダラスのアレンレクリエーション社（Allen Recreation Company）によって販売されているモデルNo.99-2138）の一部を形成している。通過された材料は次にタンクHにポンプ輸送される。このタンクHはタンクEと同じようにふた25を備えることができる。

第7図において微細に粉砕されたフィレットΔは、部分的に濾過され、ミキサー29によって攪拌され、ポンプ30によって透析器にポンプ輸送される。ミキサー29は、ベルマ・サン攪拌機（テキサス州ダラスのバントーン社販売のモデルNo.AAP112）である。ポンプ30は、スベリアステンレススチール製モデルSCS45 プロセスポンプ（ウィスコンシン州デラバンのスベリアステンレス社製）である。プロセスポンプ30には4,450rpmのバンドーモーター製の3馬力のモーター30a（Cat. No.CH3559T of the Baldor Electric Company, Ft. Smith Arkansas）が取り付けられている。ポ

ンプ30によってポンプ輸送された材料は、4個のフィルター31（図示されていない）を有する透析ユニットJ（マサチューセッツ州ウォバーン、ロミコン社製のロミコンモデルHF4SSS限外濾過システム）（Romicon Model HF4SSS ultrafiltration system made by Romicon Inc., Woburn, Massachusetts）を通過する。各フィルターはフィルターハウジング32中に収容されている。材料は一部が分岐ライン34を通過して分岐排出ライン35に取り出され得るような地点まで垂直に通過する。その他の分岐されなかった材料は、再循環返送ライン33から透析装置に戻されるか、あるいは分岐返送ライン36を通過してバットIに戻され再循環される。

置まれているアロエの面分および求められている最終製品に依存して、所望の材料が加工の後に分岐排出ライン35を通して、あるいはバットIの中で得られる。例えば過剰の水とミネラルが除去される必要がある場合には、小さなポアサイズの限外フィルターを用いて水とミネラルを分離し、ライン35を通して排出し、所望のアロエ面分をバットIに返送することができる。このプロセスは、所望の量の塩と水がバットI中にある生成物から取り除かれるまで、この生成物を透析ユニットを通して単に循環することによって繰り返されることができる。このプロセスは2つ以上の透析工程を含むことができる。例えば先に説明したように、塩、低分子量の酸および非所望のアントラキノン類は第1透析工程で取り除くことができる。非所望の材料は分岐排出ライン35から排出され、望ましい面分バットIに

戻される。この工程はロミコンから得られる10,000ドルトンのポアを有する限外フィルターを用いることによって行われる。次に10,000ドルトンの限外フィルターを、同じくロミコン社から得られる50,000ドルトンの限外濾過器で置き換え、透析プロセスを繰り返す。この透析プロセスはここでゲルマトリクスポリマーを2つの面分に分離する。第1面分は10,000~50,000ドルトンのサイズのゲルマトリクスポリマーからなり、分岐排出ライン35から排出され、第2面分は50,000ドルトンより大きいゲルマトリクスポリマーからなり、バットIに戻される。このプロセスは、与えられた生成物から取り出すことが必要とされる塩および水の量に依存して数分間ないし数時間にわたって継続することができる。このことは、局所用のアロエ製品はそれが傷をもった皮膚に使用されるような場合には調製された塩と水の含有量を持たねばならないので、重要である。塩の含有は灼熱痛と刺激を起こし得る。

第7図において分岐返送ライン36は、テキサス州ダラスのテキサスラバーサプライ社（Texas Rubber Supply Company, Dallas, Texas）によって供給されるタイゴン（Tygon）チューブ（食品グレード）製である。分岐排出ライン35は、テキサス州ダラスのバントーン社販売の316 ステンレススチール製パイプである。

#### 実施例 2

飲用のアロエベラの調製。下記の特定の保存剤を用い、実施例1によるアロエベラゲル100 ガロン（379 リットル）

を用いる：

#### 必要な装置：

1. ミキサーを備えた2個の100 ガロンステンレススチール製タンク。
2. ミキサーを備えた1個の1,000 ガロンステンレススチール製タンク。
3. ポンプを備えたホモゲナイザー。
4. ステンレススチール製スクリーン。
5. 適当な容量をもつ1個の移送ポンプ。
6. 連結ホースおよびステンレススチール取り付け具。

#### 配合操作：

原料のアロエベラゲルを収集タンクに加える前に以下の工程1および2を完了する：

1. 脱イオン水40ガロン（151.4 リットル）を加える。
2. 収集タンク中で以下の化学物質を脱イオン水に攪拌しながら溶解する（以下の第13項を参照）：  
安息香酸ナトリウム  
グリシン  
クエン酸  
ソルビン酸カリウム  
ビタミンE
3. 攪拌を継続しながら粉砕機から原料アロエベラゲルを収集タンク内に集めて合計体積100 ガロン（379 リットル）とする。
4. タンクを配合領域に移動する。

5. 次の収集タンクを粉碎機排出口の下に置く。
6. 予め消毒したホモゲナイザーを1,500psiの圧力にセットし、収集タンクに連結する。
7. ホモゲナイザーを始動し、1,000 ガロンのステンレススチール製タンクに取り付けた開放ステンレススチール製バスケットに生成物を排出する。
8. 生成物がミキサーの羽根を覆うようになったとき攪拌を開始する。攪拌を開始し1,000 ガロンのタンクが空になるまでの終了の時刻を記録する(約8時間)。
9. 低速で攪拌を続ける。
10. 生成物を透析してアロイン含有率を50ppm以下に調整し、かつ必要により過剰の酸を低下させる。
11. バニラフレーバーとシナモンオイル-天然H.S.を加え、20分間混合する。
12. 生成物は混合できるようになっている。直ちに混合する。

成 分	必 要 量
脱イオン水 (40.0ガロン)	151.4g
安息香酸ナトリウムUSP	378g
グリシン	3.0 Kg
クエン酸USP	416g
ソルビン酸カリウムUSP	189g
ビタミンE (1000単位)	1 カプセル
原料アロエベラゲル	379L(100ガロン) まで

7. 連結ホースおよびステンレススチール製取り付け具。

#### 予備的作業:

1. 予めきれいにしたタンク、ミキサーおよび取り付け具を50% IPA 溶液で消毒し、熱脱イオン水を用いてIPAを洗い落とす。
2. ポンプと付属ホースから5% HTH 溶液を排出する。水を流して洗う。
3. ポンプと付属ホースを50% IPA 溶液で消毒する。ポンプと付属ホースを、イソプロピルアルコール (IPA) がなくなるまで熱脱イオン水を流して洗う。
4. ホモゲナイザーおよび付属ホースおよびポンプを50%イソプロピルアルコール溶液で消毒する。ホモゲナイザーと付属ホースをIPA がなくなるまで熱脱イオン水を流して洗う。

#### 5. プールフィルターの消毒操作:

- (A) 水泳プール用の塩素HTH 粉末の5%水溶液をつくり、系全体に20分間循環する。

#### 配合操作:

収集タンクに安定化された原料アロエベラゲルを添加する前に工程1および2を行う。

1. 50ガロン (189 リットル) の脱イオン水を加える。
2. 収集タンク内で下記の化学物質を攪拌しながら脱イオン水に溶解する:

メチルパラベン  
ソルビン酸カリウム

成 分	必 要 量
フレーバー	

バニラ	121.0g
シナモンオイル-天然H.S.	8.0 ml

#### 実施例 3

アロエベラ化粧品を製造するためのアロエベラゲル

実施例1によって調製された微細に均質化されたアロエゲル100 ガロン (379 リットル) を、ニューヨーク州ブルックリン、アラバマアベニュー980 のロマルト (Lomart) 製のステンレススチール製珪藻土フィルターにポンプ輸送した。このフィルターは、水泳プールで使用されているタイプの典型的な珪藻土フィルターであった。実質的にすべての有機物質が珪藻土フィルターによって、均質化されたアロエゲルフィレット-保存剤溶液から取り除かれ、バルブを含まないアロエゲルフィレット-保存剤溶液が得られた。

#### 必要な装置:

1. ミキサーを取り付けた1つの100 ガロンステンレススチール製タンク。
2. ミキサーを取り付けた1個の1,000 ガロンステンレススチール製タンク。
3. ポンプを取り付けたホモゲナイザー。
4. ステンレススチール製のスクリーン。
5. 適当な容量の1つの移送ポンプ。
6. プールフィルターおよび付属品。

3. 攪拌を続けながら、粉碎機から安定化された原料アロエベラゲルを集めて収集タンク内に入れ全量を100 ガロン (379 リットル) にする。
4. タンクを配合領域に移動する。
5. 予め消毒したホモゲナイザーを1,500psiの圧力にセットし、収集タンクに連結する。
6. ホモゲナイザーを始動し、1,000 ガロンのステンレススチール製タンク内に取り付けた開放ステンレススチールバスケットに生成物を排出する。
7. 生成物がミキサーの羽根を覆ったとき、攪拌を開始する。攪拌を開始した時刻を記録する。
8. 低速で20分間攪拌を継続する。
9. 製造した100 ガロン全部を1000ガロンタンクに加える。
10. 生成物を一晩放置する。
11. プールフィルターの調製:

- A. 熱脱イオン水を用いてプールフィルターから消毒溶液を洗い流す。
- B. 10ガロンの脱イオン水に1kgの珪藻土を加え、懸濁するまで混合する。
- C. 水が明澄になるまで、プールフィルターを通して混合物を循環する。

12. 生成物を用いてプールフィルターから過剰の水を洗い流す。
13. 生成物からバルブがなくなるまで、フィルターを通

- して生成物を循環する。
14. 30分間混合する。
15. もし必要なら還析を行って黄色い液汁を50ppm以下に減少せしめ、浸透度を150 ミリオスモル未満に保持する。

成 分	必要な量
脱イオン水 (50ガロン)	189 l
メチルパラベン	681 g
ソルビン酸カリウム	379 g
原料アロエベラゲル	379 l
	(すなわち100 ガロン) まで

#### 実施例 4

##### アロエクリーム製造

実施例3によってつくられたアロエベラ化粧品製造用のアロエベラゲル71.6ガロン (271 リットル) を用いてスタートする。

##### 必要な装置:

1. カウンターモーション攪拌機およびナイロンスクレーパーを取り付けた適当な大きさの丸底ジャケット付きステンレススチール製ケトル1個。
2. 可変速ミキサーを取り付けた1個の適当な大きさの円筒状ジャケット付きステンレススチール製タンク。
3. 1個の移送ポンプ。
4. タイゴン (Tygon) および/またはポリエチレン製

グリセリン ステアレート  
ステアリル ステアレート  
ウィッケノール 163 (ウィックハム プロダクト社、フグエノット、ニューヨーク12746) (Wickeno 163 (Wichham Products, Inc., Huguenot, NY 12746))  
レキサミン p-13 (イノレックス ケミカル社、フィラデルフィア、ペンシルバニア 19148) (Lexamine P-13 (Inolex Chemical Co., Philadelphia, PA 19148))  
セチルアルコール  
ラノリン  
ミネラルオイル (軽質) (ケイドール) (デルタ・ソルベンツ・アンド・ケミカルズ、ダラス、テキサス75285) (Kaydol) (Delta Solvents and Chemicals, Dallas, TX 75285))  
ジメチコーン  
プロピルパラベン  
ビタミンEナチュラル  
レキセイ 0X-3000 (イノレックス ケミカル社、フィラデルフィア、PA 19148) (LEXEIN 0X-3000 (Inolex Chemical Co., Philadelphia, PA 19148))

2. 物質が溶融し均質化するまでゆっくり攪拌しながら75℃±5℃に加熱する。

連結ホース、ステンレススチール製取り付け具、適当な大きさのコンテナおよびステンレススチール製フィルター。

##### 予備的操作:

予めきれいにしたケトル、タンク、ミキサー、ポンプ、ホースおよびコンテナを消毒する。

##### 水性相の調製:

1. 円筒状タンクに下記の物質を加え、製造用の安定化されたアロエベラゲルが混合羽根を回った時に脱拌を開始する:

製造用の安定化されたアロエベラゲル  
プロピレングリコール  
アラントイン  
メチルパラベン  
ゲルモール115 (GERHALL 115) (登録商標) イミダゾリジニル尿素 (サットンラボラトリーズ、チャタム、ニュージャージー-07928) (Sutton Laboratories, Chatham, NJ 07928)  
ソルビトール 70  
リン酸

2. 脱拌しながら75℃±5℃に加熱し、この温度に保持する。
3. すべての物質が溶解するまで混合する。

##### 油性相の調製:

1. 別のケトルに下記の物質を加える:

##### エマルジョンの調製:

乳化をうまく行うために、配合する際に油性相と水性相を同一の温度で加えなければならない。このプロセスは中断することなく行う必要がある。

1. ゆっくり攪拌しながら水性相を油性相にゆっくり加える。
2. ゆっくり攪拌を続けながら直ちにスチームを切り、ジャケットを排液し、冷たい家庭水 (domestic water) を用いて強制冷却を開始する。
3. もし必要なら75℃±5℃の脱イオン水を用いてパッチサイズまで滴す。
4. 生成物が40℃±5℃まで冷却したとき香料を加える。
5. 30℃まで冷却したとき脱拌を止め、承認のためのサンプルを提出する。

成 分	必要な量
製造のための安定化されたアロエベラゲル (71.6ガロン)	271kg
プロピレングリコール	17.4kg
アラントイン	908g
メチルパラベン	690g
イミダゾリジニル尿素 (ゲルモール115)	2.0g
ソルビトール 70	908g
リン酸	1.05 kg

油 性 相	
グリセリルステアレート (レキセマル515) (イノレックスケミカル社, フィラデルフィア, PA 19148)	35.6kg
ステアリルステアレート (レキソールSS) (イノレックスケミカル社, フィラデルフィア, PA 19148)	8.9kg
ジオクチルアジバート (および) オクチル ステアレート (および) オクチルバルミテート (ウィッケンオール163, ウィッカム プロダクツ社, フゲノット, NY12746)	8.9kg
バルミトアミドプロピル ジメチルアミン (レキサミン P-13, イノレックスケミカル社 フィラデルフィア, PA19148)	3.5kg
セチルアルコール	3.5kg
ラノリン	3.5kg
軽質ミネラルオイル (軽質) (ケイドール) (デルタ・ソルベンツ・アンド・ケミカルズ, ダラス, TX 75285)	3.5kg
ジメチコーン	908g
アロピルバラベン	399g
ビタミンEナチュラル	363g
コカミドプロピルジモニウム	363g

#### カルボボールスラリー:

1. 混合タンクに脱イオン水を加える。ミキサーを始動する。
2. 混合タンクにすべてのカルボマー940 (カルボマー940) (B.F.グッドリッチ ケミカルグループ, シカゴ IL 60694) (Carbomer 940 (Carbopol 940) (B.F. Goodrich Chemical Group, Chicago, IL 60694)) をゆっくり加える。溶解するまで混合を続ける。
3. 一夜放置する。ミキサーを回転させ1時間混合する。

#### 水性相の調製:

1. 円筒状のタンクに次の物質を加え、脱イオン水が混合羽根を覆ったときに攪拌を開始する:  
脱イオン水 (タンクからカルボボールスラリーを濯ぐために10ガロンを残しておく)  
安定化されたアロエベラゲル  
アロピレングリコール  
トリエタノールアミン 99%  
アラントイン  
メチルバラベン  
ソルビン酸カリウム  
炭 素
2. 攪拌しながら70℃±5℃に加熱しこの温度に保持する。
3. すべての物質が溶解するまで混合する。
4. カルボボールスラリーを加え“魚の目” (“fish eyes”) 状の物がなくなるまで混合する。

#### ヒドロキシプロピルアミノコラーゲン

(レキセインDX-3000, イノレックス  
ケミカル社, フィラデルフィア, PA19148) 109g  
エリアス フラグランス #5394  
(エリアス フラグランシズ, アルックリン,  
NY 11203) 109g

#### 実施例 5

実施例3によって調製された製造のための安定化されたアロエベラゲル115 ガロン (436 kg) を出発物質とする抗刺激剤 (counter-irritant) の調製。

#### 必要な装置:

1. カウンターモーション攪拌機およびナイロンスクリューを取り付けた1個の適切な大きさの丸底ジャケット付きステンレススチール製ケトル。
2. 可変速ミキサーを備えた1個の適当な大きさの円筒状タンク。
3. 1個の移送ポンプ。
4. タイゴン (Tygon) および/またはポリエチレン製連結ホース、ステンレススチール製取り付け具、適当な大きさのコンテナおよびステンレススチール製フィルター。

#### 予備的作業:

予めきれいにしたケトル、タンク、ミキサー、ポンプ、ホースおよびコンテナを消毒する。

5. 脱イオン水でタンクを濯ぐ。

#### 油性相の調製:

1. ケトルに次の物質を加える:  
ペトロレイタム (ホワイトプロトベット (登録商標))  
デジタル・ソルベンツ・アンド・ケミカルズ, ダラス, TX 75285) (Petrolatum (White Protopet) (Delta Solvents and Chemicals, Dallas, TX75285))  
ミネラルオイル (カーネーションホワイト (登録商標))  
(デルタ・ソルベンツ・アンド・ケミカルズ, ダラス, TX 75285)  
ミネラルネイル (および) ラノリンアルコール (アメルコール L-101) (アメルカル, エジソン, NJ 08817)  
( (Amerchol L-101) (Amerchol, Edison, NJ 08817))  
アセチル化ラノリンアルコール (フランコールALA (登録商標)) (デルタ・ソルベンツ・アンド・ケミカルズ, ダラス, TX 75285)  
ステアリン酸トリプルプレスト (Stearic Acid Triple Pressed)  
グリセリルステアレート (レキセマル 515) (イノレックスケミカル社, フィラデルフィア, PA 19148)  
セチルアルコール  
ジオクチルアジバート (および) オクチルステアレート (および)  
オクチルバルミテート (ウィッケンオール163) (ウィッケンプロダクツ社, フェゲノット, NY 12746)

ホワイトオレイン酸USP  
ステアリン ステアレート (レキソールSS) (イノレックスケミカル社、フィラデルフィア、PA 19148)

プロピルバラベン

ブチルバラベン

ユーカリ油

サリチル酸メチル

カンファー

メントール

ヒスタミン二塩酸塩

シナモンオイル

2. 材料が溶融し均質化するまでゆっくり攪拌しながら70℃±5℃に加熱する。

#### エマルジョンの調製:

注: 乳化をうまく行うために、配合する際に油性相と水性相を同じ温度で加えなければならない。このプロセスは中断なく行う必要がある。

1. ゆっくり攪拌しながら、油性相に水性相をゆっくり加える。
2. ゆっくり攪拌を続けながら直ちにスチームを切り、ジャケットを排液し、冷たい家庭用水を用いて強制冷却を開始する。
3. もし必要なら70℃±5℃の脱イオンを用いてパッチサイズまで潤す。
4. 35℃まで冷却したとき攪拌を止め、承認のためのサンプルを提出する。

ミネラルオイル (および) ラノリン

アルコール (アルコール L-101)

(アメリカール, エジソン, N.J. 08817) 7.6kg

アセチル化ラノリンアルコール (ファン

コールA1A) (デルタ・ソルベンツ・

アンド・ケミカルズ, ダラス, TX 75285) 7.6kg

ステアリン酸トリプルプレスト 23.5kg

グリセリルステアレート (レキセマル 515)

(イノレックス ケミカル社, フィラデルフィア

PA 19148) 10.3kg

セチルアルコール 0.2kg

ジオクチルアジベート (および) オクチル

ステアレート (および) オクチルパルミテート

(ウィッケノール 163) (ウィッケンプロダク

ツ社, フェゲノット, NY 12748) 10.3kg

ホワイト オレイン酸USP 1.1kg

ステアリンステアレート (レキソールSS)

(イノレックスケミカル社, フィラデルフィア,

PA 19148) 1.1kg

プロピルバラベン 1.1kg

ブチルバラベン 1.1kg

ユーカリ油 21.8kg

サリチル酸メチル 138 kg

カンファー 21.8kg

メントール 21.8kg

アルを提出する。

成 分	必要な量
<u>カルボボールスラリー</u>	
脱イオン水 (30ガロン)	113kg
カルボマー 940 (カルボボール940)	
(B. F. グッドリッチケミカルグループ, シカゴ, IL 60694)	4.38 kg
<u>水 性 相</u>	
製造のための安定化されたアロエバゲル (115 ガロン)	436kg
脱イオン水 (41.5ガロン)	157kg
プロピレングリコール	54.5kg
トリエタノールアミン99%	9.8kg
アライトイン	653 g
メチルバラベン	1.1kg
ソルビン酸カリウム	545 g
尿 素	21.8kg
<u>油 性 相</u>	
ベトリウムUSP (ホワイト) (デルタ・ ソルベンツ・アンド・ケミカルズ, ダラス, TX 75285)	8.2kg
ミネラルオイル (カーネーションホワイト) (デルタ・ソルベンツ・アンド・ケミカルズ, ダラス, TX 75285)	8.2kg

ヒスタミン二塩酸塩 545g

シナモンオイル 218g

#### 実施例 6

凍結乾燥したアロエの調製。実施例2で調製したアロエバゲル1リットルを用いて開始する。ジュースを凍結乾燥ユニットに入れ、約45gの凍結乾燥アロエを製造する。

#### 実施例 7

局所創傷用ゲルの調製。実施例3により調製したアロエバゲルを用いて開始し、透析によって190%まで濃縮する。

#### 必要な装置:

1. ミキサーを備えた2個の適当な大きさのステンレススチール製タンク。
2. 1個のロミコン (Romicon) 濃縮システム。
3. 1個の移送ポンプ
4. タイゴン (Tygon) および/またはポリエチレン製連結ホース、ステンレススチール製取付け具、適当な大きさのコンテナおよびステンレススチール製フィルター。

#### 予備的作業:

1. 製造プロセスの間に使用する予めきれいにしたタンク、ミキサー、ポンプ、ホースおよびコンテナを消毒する。
2. 製造の一日前にカルボボールスラリーを調製する。
3. 予めきれいにしたロミコン濃縮システムを消毒する。系全体を脱イオン水で洗浄し、37%過酸化水素を流し、一晩放置する。

床ずれ治療用皮膚創傷ゲル製剤のためのアロエベラゲルの調製:

1. 過酸化水素がなくなるまで濃縮装置を脱イオン水で洗う。

2. 190 %ゲルの生成物を濃縮するのに必要な計算量の抽出物をアロエベラゲルから分離する。

カルボボールスラリー:

1. 混合タンクにアロエベラゲル - 190%を加える。

ミキサーを始動する。

2. 混合タンク内の水にカルボマー 940 (カルボボール 940) (B. F. グッドリッチケミカルグループ, シカゴ IL 60694) をゆっくり加える。溶液和するまで混合を続ける。

3. 一晚放置する。ミキサーを始動し、1時間混合する。

混合操作:

1. 適当な大きさの混合タンクに、次の物質を加え羽根が回ったときにミキサーを始動する。

アロエベラゲル 190%

バンテノール

アラントイン

L-グルタミン酸

イミダゾリジニル尿素 (ゲルモール 115) (サットンインダストリーズ, チャタム, NJ 07928)

ソルビン酸カリウム

安息香酸ナトリウム

トリエタノールアミン 99 %

2. 100メッシュのステンレススチール製スクリーンを通して濾過したカルボボールスラリーを加えながら混合を継続する。

3. “魚の目”状の物がなくなるまで混合する。

4. pHを読み取り記録する。pH範囲 5.0 ± 0.5

5. もし必要ならクエン酸またはトリエタノールアミンを用いてpHを調整する。

6. pHを記録する。

7. 生成物ができあがったとき、承認のためのサンプルを提出する。

8. 充填するための準備ができたとき 100メッシュのステンレススチール製スクリーンを通して充填ホッパー中にポンプ輸送する。

成 分必要な量カルボボールスラリー:

濃縮された安定化されたアロエベラゲル  
(5 × 190 % (75ガロン))

204kg

カルボマー 940 (カルボボール 940)  
(B. F. グッドリッチケミカルグループ  
シカゴ, IL 60694)

13.3kg

濃縮された安定化アロエベラゲル  
(5 × 190 %) (403 ガロン)

1523kg

バンテノール

37.9kg

成 分必要な量

アラントイン

11.4kg

L-グルタミン酸

5.7kg

イミダゾリジニル尿素 (ゲルモール 115)

(サットン ラボラトリーズ, チャタム

N.J. 07928)

1.9kg

トリエタノールアミン 99%

13.3kg

ソルビン酸カリウム

945 g

安息香酸ナトリウム

1.9kg

実施例 B

畑から直接もってきた洗っていない葉 100kgを用いて開始する。51.2kgのアロエ ベラジュースをトンプソンマニファクチャリング社 (ハーリングン, テキサス, 78550) 製の“トンプソンアロエジュース抽出器”を用いて集める。この抽出器は、この製造業者が提供する指図に従って運転される。得られた51.2kgのアロエジュース抽出物は、

0.1%メチルパラベンを加えられ、ミキサーを備えた 100ガロンステンレススチール製タンク内で 20 分間混合された。次にこの溶液は、アントラキノン含有率が50ppm未満となるまでロミコン限外濾過装置を用いて透析される。このゲルは、実施例4のアロエクリームを製造するために用いられる。

分離および単離プロセス

上記の通り、分離プロセスにおいて、ゲルマトリクス

トリップの形態のアロエベラの葉のフィレットにした内部ゲルマトリクス部分を均質化し、濾過して間質線維成分部分 (Sub-portion) を除去し、残存マトリクス細分部分を残すことができる。この残存マトリクス細分部分を次に処理して、アロエベラゲル中の活性化学物質、カリシン (登録商標) を分離し、単離し精製することができる。残存マトリクス細分部分からカリシンを分離するために、水溶性低級脂肪酸極性溶媒の過剰量を残存マトリクス細分部分に加える。そうするとカリシンがこの混合物から析出を始める。この溶液をできる限り多量の活性成分が溶媒から析出することを許すのに十分であるが、カリシンが分解を始めるほど長くはない時間静置する。この時間の後に上澄みを、沈降した析出物を振り動かさないようにデカントし、あるいはサイフォンで取り去る。次に析出物と残存溶液を適当な遠心分離装置に入れ、集めてベレットにする。遠心分離の後、上澄みをデカントし、捨てる。所望により、このベレットを新鮮な水溶性低級脂肪酸極性溶媒の少量で洗浄し、再び集め、上澄み液を再び捨てる。次にこのベレットを凍結乾燥し、一晚乾燥させる。得られた生成物は、実質的に非分解性の凍結乾燥された形のカリシンである。得られた生成物は、粉碎して粉末にすることができる。

カリシンを分離し単離するための剤の好ましいプロセスは、次の工程を含む。

戸外で生育した成熟したアロエベラ植物からの葉を、好ましくは加工を行う前に葉のいかなる部分も損傷すること

なく、この植物の基部付近から引き取りもしくは切断する。好ましくは、葉は茎（葉柄）の莖上でこの植物の基部で切断され、明瞭な細胞ゲルの露出または黄色い液汁によるゲルの汚染を防止するために茎から剥がされる。

植物から分離した後、葉の根本および先端部は取り除かれ、切断した葉は、分画プロセスにおいて述べたようにフィレットを形成するために皮をむかれる。

次に内部ゲルマトリクスを液化するために、得られたフィレット（内部ゲルマトリクス）を粉碎し、細断し、あるいはブレンドして、内部に存在する間質繊維をばらばらにする、あるいはワイヤメッシュまたはフィルタースクリーンに強制的に通過させる。得られた液化内部ゲルマトリクスを次に均質化する。このようにして得られた均質化抽出物は典型的にはおよそ約4～約5、好ましくは約4のpHをもっている。均質化された抽出物を次に濾過して間質繊維を取り除く。この均質化し濾過された抽出物を次に、すぐに述べた残存マトリクス粗部分と同様に処理し、カリシンを分離し単離することができる。

カリシンを分離し単離するためのもう一つの別の好ましいプロセスは次の工程を含む。

戸外で生育した成熟したアロエベラ植物の葉を、好ましくは加工する前に葉のいかなる部分も損傷しないように、この植物の基部付近から引き取りあるいは切断する。好ましくは、葉を茎（葉柄）の莖上で植物の基部において切断し、明瞭な細胞ゲルの露出または黄色い液汁によるゲルの

ル溶液で消毒した。ポンプおよび付属ホースをIPA がなくなるまで熱脱イオン水で洗い流した。

4. ホモゲナイザーおよび付属のホースおよびポンプを50%イソプロピルアルコール溶液で消毒した。ホモゲナイザーと付属のホースをIPA がなくなるまで熱脱イオン水で洗い流した。

リオグランデバレーから収集したアロエ バルバデンシス ミラーの葉を、収穫した後8時間以内に40～50° Fの冷凍トラックに移し、分解を少なくするために加工処理されるまで40～50° Fの冷凍下で貯蔵した。

次に貯蔵した葉20～60ポンドを、室温の次亜塩素酸カルシウム水溶液の予備洗浄浴中に入れて、実質的に葉から表面の汚れを取り除きかつ葉の上の表面バクテリアを殺した。次亜塩素酸カルシウムの水溶液は、1リットルの水に98%、次亜塩素酸カルシウム約 0.125gを加えて、遊離塩素50ppmを含む溶液とした。葉を約5分間この予備洗浄浴中にとどめた。

次に実質的に汚れとバクテリアを除いた葉をテキサス州ハーリングゲンのトンブソンマニファクチャリング社製の“トンブソンアロエウォッシャー”の水平コンベアベルトの上に置いた。このトンブソンアロエウォッシャーは、葉から表面の汚れと次亜塩素酸カルシウム水溶液を除去するために室温の水で葉を洗った。再びこの葉を視覚的に検査し、必要な場合には葉を手でこすって葉の表面に残存する表面の汚れを除去した。次にこの葉を室温の水で濯いだ。

汚染を防止するために茎から剥がす。

次にこの葉を、適当な手段、例えばテキサス州ハーリングゲンのトンブソンマニファクチャリング社製の“トンブソンアロエ押出機”により砕き、アロエジュースを押し出す。押し出されたアロエジュースを次に上記残存マトリクス粗部分と同様に処理してカリシンを分離し単離することができる。

ここに述べたプロセスのすべての工程は、好ましくは約-50°Cで行われる凍結乾燥工程を除き、およそ室温で行われる。

本発明の開示されたプロセスおよび組成物の種々の改変ならびに代替的改変、変形、均等物は、上記の一般的な説明を読めばこの技術分野の当業者に明らかになる。以下の実施例は例示的なものであって、このような改変、均等物または変形をカバーする添付したクレームの範囲を制限することを意図したものではない。

#### 実施例 9

カリシンを分離し、単離するためのプロセス

##### A. 予備的作業:

1. 予めきれいにしたタンク、ミキサーおよび取付け具を50%イソプロピルアルコール (IPA) 溶液により消毒し、IPA を熱脱イオン水で濯ぎ落とした。
2. ポンプおよび付属のホースを5% “ITH” 塩素水溶液を用いて洗い流し、次いで水で洗い流した。
3. ポンプおよび付属ホースを50%イソプロピルアルコール

次に先端部および根本部を各葉から取り除き、葉を、ロート状ステンレススチール製コレクターの頂部に配置された、それぞれがメッシュの底を有するステンレススチール製バスケットタイプコンテナの中に入れた。黄色い液汁が約30分間この葉から排出するのを許した。黄色い液汁はステンレススチール製バスケットのメッシュの底を通過し、ロート状コレクターに集められた。

アロエの葉を収容するステンレススチール製バスケットタイプコンテナはコレクターから離され、コンテナに対して向流的に移動する連続的に水平に流れる濯ぎ水の室温の水浴を含む第2のステンレススチール製容器中に沈められた。このコンテナは約30分間～1時間で容器の一端から他端に手でゆっくり動かされる。これは、黄色い液汁が葉からさらに排出することを許す。葉は、この溶液中に30分間浸漬された。

次に葉をこの溶液から取り出し、シャープなナイフまたはワイヤーチーズスライサーを用いてそれぞれの葉から外皮を取り除いて、それぞれの葉の部分からアロエゲルフィレットをつくった。このアロエゲルフィレットは視覚的に検査され、特徴的黄色い変色によって検出された汚染されたアロエゲルフィレットもしくはフィレットの部分は捨てられた。汚染されていないアロエゲルフィレットの全重量は、葉の大きさおよび条件に依存して出発の葉の重さの20～60%であった。

汚染されていないアロエゲルフィレットを次に、750座

席のレストラン用のステンレススチール製くず処理ユニットに入れた。この処理ユニットはフィレットを、濃厚なしかし自由に流動する（粗均質化された）液体のコンシステンシーの平均粒子サイズまで粗砕した。このステンレススチール製くず処理ユニットは、エマーソンエレクトリック社（レーシン、WI）のN-シンクレーターディビジョン製のモデルNo. SS-150-13、シリアルNo. 115132であった。

次にこの粗砕したアロエゲルフィレットを100ガロンのステンレススチール製保持バットに移した。この保持バットは、ミシガン州ベルディングのアロセス・イクイップメント社製のモデルNo. 100ガロンOVC、シリアルNo. 40865-3であった。

保持バットから、粗砕したアロエゲルフィレット溶液をホモゲナイザーにポンプ輸送した。このホモゲナイザーは、イリノイ州シカゴのクレバコ・フード・イクイップメント・アンド・リフリジレーション社製のシリアルNo. 04-03であった。このホモゲナイザーは、牛乳の均質化のための酪農プロセスにおいて一般に使われているタイプのものであった。粗砕アロエゲルフィレット溶液を約1,500psiの圧力で微細に均質化した。

ホモゲナイザーから、微細に均質化したアロエゲルフィレット溶液をステンレススチール製貯蔵タンクにポンプ輸送した。この貯蔵タンクはミシガン州ベルディングのアロセス・イクイップメント社製のモデルNo. 1000ガロンOVC、

シリアルNo. 40866-2であった。均質化したアロエゲルフィレット溶液の全重量は、原料葉の重量の20~60%であった。次にもし必要なら、この均質化した生成物を膜外濾過を用いて透析した。

次に、微細に均質化したアロエゲルフィレット溶液をレスリー（Leslie）の珪藻土フィルターモデルDE-48を用いて濾過して、間質繊維を除去した。この間質繊維自身が、珪藻土の代わりに濾過媒体として使用され、繊維はナイロンメッシュ、布フィルター支持体によって支持された。十分な量の繊維が蓄積して濾過媒体として機能することができるよう、出口を開放する前にゲルを数分間フィルターを通してポンプ輸送した。

濾過したアロエゲルフィレット溶液20ガロンを次に、100ガロンのタンクにポンプ輸送し、190プルーフの未変性エタノール（エチルアルコール、190プルーフ、U.S.P.、正味、54ガロンバッチ1.D.#CT 185J04、イリノイ州61953タスコラ、P.O.ボックス218のU.S.インダストリアル・ケミカルズ社から入手できる）80ガロンをアロエゲルフィレット溶液に加えた。

次にこのアルコール-ゲル溶液を直ちに、18-8ステンレススチール製の直径10.5インチ、高さ8インチのいくつかの11クォートパン（イリノイ州シカゴのブルームフィールド・インダストリーズ社製、テキサス州ダラス3712ハガーウェイのワトソン・フード・サービス・イクイップメント・アンド・サプライズから入手できる）に移した。

次にこのアルコール-ゲル溶液を約4時間静置した。次に明確な上澄み液を、パンの底に沈んだ析出物を撈り動かさないように注ぎながらデカントもしくはサイフォンで抜き取った。析出物および残存する溶液を次に、4つの1バイントステンレススチール製遠心分離バケットに、各バケットに析出物と残存溶液約500gが入るように移した。次にこのバケットを、IEC センドラ-7 遠心分離機(02194マサチューセッツ州ニードハムハイツ300セカンドアベニュー、インターナショナル・イクイップメント社製、75050、テキサス州グランドプレイリー、P.O.ボックス1048、アメリカン・サイエンティフィック・プロダクツから入手できる)（IEC Centra-7 Centrifuge (International Equipment Co., 300 2nd Avenue, Needham Heights, Massachusetts 02194, American Scientific Products, P.O. Box 1048, Grand Prairie, Texas 75050)）を用いて2000×gで約10分間回転させた。

遠心分離した後、上澄みをデカントして捨てた。次にベレットを、新鮮な190プルーフ未変性エタノールで洗い、再び2000×gで約10分間遠心して集めた。遠心後、再び上澄みを捨てた。

次にこのベレットを、数個の600ccのバーチス（VIRTIS）凍結乾燥ジャーに移し、液体窒素中で凍結するまでぐるぐる動かした。次にこの凍結乾燥ジャーを、ウェルチデュオーシール真空ポンプ（モデルNo. 1402、75235テキサス州ダラス、P.O.ボックス35445、サージェント-ウェ

ルチから入手できる）、バーチスイマーシオンコイルクーラー（モデルNo. 6205-4350、クーラーアセトン浴中）およびバーチス18ポート真空ドラムマニホールド（モデルNo. 6211-0350）からなる凍結乾燥装置に取付けた。すべてのバーチス装置は、75050テキサス州グランドプレイリー、P.O.ボックス1048、アメリカン・サイエンティフィック・プロダクツから入手できる。凍結乾燥ドラムを-50℃に保ったアセトンで洗った。

サンプルを乾燥まで1晩凍結乾燥し、次にメトラ-NE 163天秤で秤量した。残存するサンプルは、実質的に非分解性の凍結乾燥されたカリシンより成った。アロエベラゲル50ガロンからの収量は、カリシン約370~380gであった。

#### 実施例 10

カリシンの分離および単離プロセス

リオグランデバレーから集めたアロエ バルバデンシス ミラーの葉を、収穫後8時間以内に40~45°Fの冷凍トラックに移し、分解を少なくするために処理するまで40~45°Fで冷凍貯蔵した。

次にそれぞれの葉から先端部分と根本部を取り除いた。次にシャープなナイフまたはワイヤーチーズスライサーを用いてそれぞれの葉から外皮を取り除いて、各葉の部分からアロエゲルフィレットをつくった。

次にアロエゲルフィレットを750座席のレストラン用のステンレススチール製くず処理機に入れた。このくず処理



膜は、フィレットを濃厚な、しかし自由に流動する（粗均質化された）液体のコンシステンシーの平均粒子サイズまで粗砕した。このステンレススチール製くず処理機は、ウィスコンシン、レイシンのエマーソン・エレクトリック社のN-シンクローイレーターディビジョン製のモデル№SS-150-13、シリアル№115132であった。次にこの粗砕アロエゲルフィレットを100ガロンステンレススチール製保持バットに移した。この保持バットは、ミシガン州ベルディングのプロセス・イクイップメント社製のモデル№100ガロンOVC、シリアル№40865-3であった。

保持バットから、粗砕アロエゲルフィレット溶液をホモゲナイザーにポンプ輸送した。このホモゲナイザーは、イリノイ州シカゴのクレバコ・フード・イクイップメント・アンド・リフリジレーション社製のシリアル№04-03であった。ホモゲナイザーは牛乳の均質化のための酪農プロセスにおいて一般的に使用されているタイプのものであった。粗砕したアロエゲルフィレット溶液を1500psiの圧力下で微細に均質化した。

ホモゲナイザーから、この微細に均質化したアロエゲルフィレット溶液をステンレススチール製貯蔵タンクにポンプ輸送した。この貯蔵タンクは、ミシガン州ベルディングのプロセス・イクイップメント社製モデル№1000ガロンOVC、シリアル№40866-2であった。均質化したアロエゲルフィレット溶液の全重量は、原料葉の重量の20〜60%であった。次にもし必要なら、均質化した生成物を限外濾

過を用いて過析した。

次に、均質化したゲルをレスリーの珪藻土フィルターモデルDE-48を用いて濾過した間質繊維を取り除いた。この間質繊維自身が、珪藻土の代わりに濾過媒体として使用され、繊維はナイロンメッシュ布フィルター支持体によって支持された。十分な量の繊維が蓄積して濾過媒体として機能することができるように、出口を開放する前に数分間フィルターを通してゲルをポンプ輸送した。

次に20ガロンの濾過したゲルを100ガロンタンク中にポンプ輸送し、60ガロンの190ブルーフ未変性エタノール（エチルアルコール190ブルーフU.S.P., 正味, 54ガロンバッチ1.0. #CT185 J04, 61953イリノイ州タスコラ, P.O.ボックス218U.S.インダストリアル・ケミカルズ社から入手できる）をこのアロエゲルフィレット溶液に加えた。

このアルコール-ゲル溶液を16-8ステンレススチール製の直径10.5インチ、高さ8インチの数の11クォートパン（イリノイ州シカゴのブルームフィールド・インダストリーズ社製、テキサス州ダラス、3712ハンガーウェイのワトソン・フード・サービス・イクイップメント・アンド・サプライズから入手できる）に直ちに移した。

このアルコール-ゲル溶液を約4時間静置した。

明確な上澄み液を次に、パンの底に沈んだ析出物を揺り動かさないように注意しながらデカントあるいはサイフォンで抜き取った。次にこの析出物と残存する溶液を、4個の1バイントのステンレススチール製遠心分離バケットに

各バケットに約500gの析出物と残存溶液が入るように移した。次にこのバケットを、IEC セントラ-7遠心分離機（02194マサチューセッツ州ニードハムハイツ、300セカンドアベニュー、インターナショナル・イクイップメント社製、75050テキサス州グランドプレリー、P.O.ボックス1048、アメリカン・サイエンティフィック・プロダクツから入手できる）を用いて2000×gで約10分間遠心した。

遠心分離後、上澄み液をデカントし捨てた。次にバレットを新鮮な190ブルーフの未変性エタノールで洗い、再び2000×gで約10分間遠心分離した。遠心分離後、再び上澄み液を捨てた。

次にこのバレットを、数個の800wバーチス凍結乾燥ジャーに入れ、液体窒素中で凍結するまでぐるぐる動かした。次にこの凍結乾燥ジャーをウェルチデュオ-シール真空ポンプ（モデル№1402、これは75235テキサス州ダラス、P.O.ボックス35445、サージェント-ウェルチから入手できる）、バーチスマーシオンコイルクーラー（モデル№6295-4350クーラー、アセトン浴中）およびバーチス18ポート真空ドラムマニホールド（モデル№6211-0350）からなる凍結乾燥装置に取付けた。すべてのバーチス装置は、75050テキサス州グランドプレリー、P.O.ボックス1048、アメリカン・サイエンティフィック・プロダクツから入手される。凍結乾燥ドラムに-50℃に保持したアセトンを満たした。サンプルを1晩乾燥を許し、次いでメトラ-NE 163天秤で秤量した。残存サンプルは、実質的に非分解性

の凍結乾燥されたカリシンから成った。50ガロンのアロエベラゲルからの収量は、カリシン約370-380gであった。

#### 実施例 11

カリシンを分離および単離するための標準的な実験室規模のプロセス

約50ポンドのアロエ バルバデシス ミラーの葉を水で洗いそしてこすって、汚れた乾燥したラテックスとその他の汚染物を除去した。次にそれぞれの葉の外皮を除去し、フィレット全体を大きなビーカー（氷上）に入れた。

1.5 リットルバッチでアロエフィレット全体をワーリングブレンダー（Waring blender）にかけた。フィレットを室温で2分間高速で2回ブレンダーした。このブレンダーしたフィレットを次に4℃に冷却してブレンダー操作中に発生した泡を消失させた。

次にこのブレンダーしたアロエジュースを4層のコットン（クリーブランドコットン）に通して濾過して繊維質のセルロース系バルブを除去した。次に濾過液を6層のコットンに通過させ、約4リットルのアロエジュースを集めた。

次にこのアロエジュースを大きな5ガロンのステンレススチール製コンテナに入れた。この濾過したジュースに、16リットルの冷却したエタノール（フィッシャーエタノール試験級 Cat. №A985）を加えた。このエタノールは、アロエジュースを攪拌しながらゆっくり加えた。綿状の析出物が形成された。混合物を15〜30分間攪拌し、室温で約2時間静置した。

次に上澄み液をデカントして除き、ペレットを小さなブレンダーに入れ、このブレンダーに1リットルの脱イオン水を加えた。この混合物を低速で数分間ブレンダーでペレットを洗浄し、次いで8リットルのナルゲン(nalgene)コンテナに入れた。この混合物にさらに4リットルのエタノールを加え、混合物を30分間攪拌した。生成した析出物を約2時間沈降させた。

上澄み液の大部分をデカントして除き、得られたペレットを室温で20分間2000×gで遠心分離して、残りの母液をデカントし易くするために析出物をペレット化した。

次にこのペレットを凍結乾燥フラスコに入れ、バーチス凍結乾燥機中で1晩凍結乾燥した。

凍結乾燥された粉末の重量は10.9gであった。収率は0.273%すなわち $2.73 \times 10^{-3} \text{ g/mg}$ であった。

#### カリシンの特徴づけ

歴史的な視点から見ると、アロエベラは数世紀にわたって創傷治癒剤として用いられてきている。また胃潰瘍などの胃腸障害に良いと考えられ、また関節炎の治療に有効であると考えられてきた。例えばデューク、ジェームスA., CRCハンドブック・オブ・メディシナル・ハーブス, CRCプレス社ボカラトン, フロリダ, 31ページ1985; ヘンリー, R., コスメティクス・アンド・トイレットリーズ, アン・アップデテッド・レビュー・オブ・アロエベラ: アルアードパブリッシング社94巻42~50ページ1979; およびモートン, ジュリア, F., フォーク・ユース・オブ・アロエベラ

ド・コマーシャル・イクスプロイテーション・オブ・アロエリーフバルブ: エコノミックボタニー15巻311~318ページ, 1961 (Duke, James A., CRC Handbook of Medical Herbs, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, pp.31, 1965; Henry, R., Cosmetics and Toiletries, An Updated Review of Aloe Vera: Allied Publishing Corp., Vol.94, pp.42-50, 1979; Horton, Julia F., Folk Uses and Commercial Exploitation of Aloe Leaf Pulp: Economic Botany, Vol.15, pp.311-318, 1961)を参照されたい。しかし上記の通りアロエベラのこれらの特製に関与するアロエベラ中の化学物質はこれまでに、同定および特徴付けられていない。

製薬学的なスクリーニング手法を用いて、アロエベラから抽出されたポリサッカライドがアロエベラ中の活性化学物質であることが今、見出された。このポリサッカライドは以下カリシン(登録商標)と呼ばれる。カリシンは実質的にアセチル化されたマンノースモノマーの秩序正しい線状ポリマーである。蛋白質、有機酸、アントラキノン類、ビタミンおよびアミノ酸のようなその他の成分は、カリシンの1%未満を構成する。アロエベラ中のカリシンの濃度は、アロエベラジュースの約0.05~0.3重量%であることがわかった。葉の中のカリシンの収量はすなわち濃度は、葉の成熟度合に依存する。

アロエベラ植物の全体を出発物質として用い、ある種の薬理学的モデルを用いて活性をスクリーニングすると、こ

の植物は系統的に複数の部分に分けられた。それぞれの部分について薬理学的活性が試験され、不活性部分は捨てられた。次に活性部分をさらに小さな部分に分け、そのたびに不活性部分を捨て活性部分を保持し、これを活性物質カリシンが単離されるまで行った。さまざまな部分の活性は、薬理学的モデルとしてラットの潰瘍保護及び組織培養したヒト繊維芽細胞の刺激を用いて測定した。

カリシンがアロエベラ中の活性化学物質であることを証明する薬理学的データは、次のように要約することができる。

1. カリシンの投与量-効果(dose-response)は、等量のカリシンを含むアロエベラジュースと同じであった。
2. カリシンは、さまざまな投与ルートすなわち経口内、腹腔内および経口投与によって潰瘍保護モデルにおいて有効であった。
3. カリシンは、薬理学的モデルの両者における効果の100%を成す。
4. 全く異なる際、コンジャク(konjac)植物からのカリシンに類似する物質である化学物質グルコマンナンは、いくつかの薬理学的作用を示した。

カリシンは、やけど、潰瘍その他皮膚および胃腸管壁の創傷に対して関係することが知られている組織培養における繊維芽細胞の複製を48時間で300%まで増加することが実験室の研究で示された。

カリシンはまた、繊維芽細胞の核中のDNA合成を増加す

ることが示された。そしてDNA合成の増加は、治癒プロセスにおける基礎的なステップである代謝活性および細胞複製の速度を大きくする。

カリシンは動物の治癒速度を増大することが制御された研究において示された。

カリシンはまた、動物の研究において胃潰瘍の有効な治療剤であることが示された。その胃がヒトの胃と同様に反応する実験室用ラットが3年間に亘って試験された。カリシンは、胃潰瘍の治療に使用されている現在の医薬品と同様もしくはこれより優れていることが見出された。このような製品の多くのものは、胃内の胃酸を抑制するように作用する。カリシンは異なる原理に基づいて作用し、消化酸の自然の流れを変えるものではない。

上記の通り、カリシンは、液化したアロエベラゲルに水溶性低極脂溶性溶媒、好ましくはエテルアルコールを加えることによって析出させることができる。カリシンの粉末は次に凍結乾燥することによってつくることができ、所望により、この凍結乾燥製品をモウリネックスコービーグラインダー(テキサス州ダラスのシラズ(Dillard's)から入手できる)のような粉砕装置を用いて粉砕し粉末にすることができる。カリシンの粉末は、高度に懸濁性であり、何らかのアントラキノン夾雑物の酸状態に依存して黄ばんだ白色からピンクないし紫色の無定形粉末である。カリシンは、加水分解を引き起こす水を除去する凍結乾燥によって安定化され実質的に非分解性となる。所定量のカ

リシンを含む凍結乾燥されたアロエベラゲルは、その有効性を2年間保持した。凍結乾燥した形のカリシンは10年まで安定であると考えられる。

粉末化したカリシンの製造において熱と時間が重要なファクターであることがわかった。熱はカリシンの加水分解もしくは分解を助長し、所定の温度におけるカリシンの加工時間が長くなればなるほど分解が多くなる。従って、高分子量のカリシン粉末が望ましい場合には、アロエベラの凍全体からカリシンを最も早く抽出することができるプロセスを使用することが好ましい。低分子量のカリシン粉末が望ましい場合には、アロエベラの凍全体からカリシンを最もゆっくり抽出することができるプロセスを使用することが好ましい。

0.2 ~ 1%の重量/容量濃度のカリシン粉末を再水和すると、新鮮なアロエベラのような粘稠な“ゲル”が再び形成された。カリシン粉末の再水和によって復元するこのゲルのようなコンシステンシーは、カリシンの高分子量ポリサッカライドの性質を示している。一般に、ポリサッカライドは分解または加水分解されるとその粘度が低下する。従って、再水和したカリシン粉末の粘度が品質の優れた表示を与え、品質保証のパラメーターとして使用されることが出来る。

本発明のプロセスに従って製造されたカリシンは、アセチル化マンノースモノマーの、好ましくは相互に $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) 結合によって結合された実質的に非分解性の凍結乾燥

ノ分；溶出溶媒HPLCグレードの水）は、マンノースの存在ならびにグルコース標品と共に溶出されたピークを示した。この“グルコース”のピークは、広い非対照のピークであり、これはそれが汚染されたグルコースを含んでいることを示していた。わずかに異なる濃度で行った酸加水分解は、同様の結果を与え、グルコマンナンは明確なグルコースとマンノース生成物を与え、またカリシンは明確なマンノースピークとグルコース標品と同じ保持時間で少なくとも移動する1つのピークを与えた。

次にこの2種類のポリサッカライドを、粗セルラーゼ製剤を用いて酵素加水分解に付した。市販のグルコマンナンを加水分解し、そしてHPLC（同一の条件）によって分析すると、よく分離されたグルコースとマンノースのピークおよびグルコースよりも早く移動する他の3つのピークが認められた。ソー、トリーおよびテトラサッカライド部分を示すこれらのピークは、おそらくポリサッカライドの分枝あるいは不完全な加水分解によるものと思われた。酵素製剤は半精製製剤であったので、その他の糖加水分解酵素が疑いなく存在しており、この酵素製剤の結合特異性の正確な決定は行うことができなかった。カリシンを同じ酵素処理にかけると、極めて異なったプロファイルがHPLCで認められた。この酵素加水分解は、マンノース、グルコースおよびより大きな加水分解オリゴマーに対応する少なくとも2つのより大きなピークを与えた。実際、多くのポリサッカライドを、これらのより大きな分子鎖フラグメント

された秩序正しい線状ポリマーとして特徴付けることができる。

本発明の開示された組成物のさまざまな改変ならびに代替的改変、変形および均等物は上記一般的な説明を読めばこの技術分野の当業者に明らかになる。次の実施例（実施例（12~44）は、カリシンおよび他のアロエ種から単離された同様のポリサッカライドをさらに特徴付けかつ同定するために行われた。以下の実施例は例示的なものであって、上記の改変均等物もしくは変形をカバーする添付されたクレームの範囲を制限することを意図したものではない。

#### 実施例 12

比較高性能液体クロマトグラフィー (HPLC)

商業的に入手できるグルコマンナン（日本のこんにゃく植物から単離されたポリサッカライド、ジェネラルニュートリションセンターから購入した）は、薬理学的スクリーニングモデルにおいてカリシンと同様ないくつかの挙動を示した。このこんにゃくマンナン（以下グルコマンナンと呼ぶ）は、カリシンを特徴付けるのに使用されているが、かなり異なるものであることがわかった。

最初の実験は、グルコマンナンとカリシンについて並列的に行われた。これらのポリサッカライドの両者を1モル濃度硫酸（0.01gポリサッカライド/2ml硫酸）中で110℃、減圧下で24時間酸加水分解に付した。加水分解された生成物の高性能液体クロマトグラフィー (HPLC)（バイオラド アミネックス HPX-87Cカラム；R.I.検出器；流量0.6 ml

中で見出すことができた。このことは、その構成（すなわち結合の種類および分枝の程度）が市販のグルコマンナンとは有意に異なっていることを示しているものと思われる。酸加水分解は一般的な加水分解法であり、酵素加水分解は酵素が作用する結合の種類に関してはるかに特異的である。

#### 実施例 13

カリシンの特徴づけを助けるために、大きなポリマーサッカライドを化学加水分解により分解した。加水分解はアルバーシェイム、Pら（アルバーシェイム、P.；ネビンズ、D.J.；イングリッシュ、P.D.；およびカール、A（1967）カーボハイドレート リサーチ、5、340 - 345）（Albersheim, P.; Nevins, D.J.; English, P.D.；Karr, A (1967) Carbohydr. Res. 5, 340 - 345）によって開発された方法を修正した2H トリフルオール酢酸溶液（2N TFA）中で行った。加水分解物を真空オーブン中で乾燥し、0.01N  $H_2SO_4$  で戻しHPLC分離に用いた。

加水分解物のHPLC分離；

加水分解物の分離は、ヒューレットパッカード液体クロマトグラフモデル1084-Bを用いて行った。溶出物をモニターするために、クロマトグラフにバイオラドモデル1770屈折率検出器が取り付けられていた。分離カラムは、水系型のインターラクションカチオン交換樹脂を充填した0.65  $\times$  30cmのベッドを含むインターラクションORH - 801有制限カラムであった。

移動相は温度35℃、流量0.5 ml/分の0.01N

表 1

サンプル#	ガラクト ン酸 (領域)	グル コース (領域)	マン ノース (領域)	ラム ノース (領域)	アラビ ノース (領域)	酢酸
パッチ #1	痕跡	478	14279	—	—	5818
パッチ #3	584	痕跡	16926	—	—	4538
パッチ #3B	2320	痕跡	15068	—	—	5553
パッチ #5B	592	209	13158	—	—	7888
パッチ #8B	1238	痕跡	15049	—	—	5392
パッチ #6B	痕跡	329	12686	—	—	7465
C-701008	痕跡	痕跡	13734	—	—	6240
パッチ #4	痕跡	1260	17000	—	535	7899
パッチ #8B	痕跡	286	13715	—	—	6677
(選析)						
C-813006	痕跡	痕跡	13571	—	—	5702
* シュクロース						
オクタアセテート	—	2580	—	—	—	6407
* グルコマンナン	441	10380	15050	—	—	5553
(こんにゃく)						
(* こんにゃく植物からのグルコマンナンとシュクロースオクタアセテートは、参照標品として含まれた。)						

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>であった。単糖および酸標品を用いて、クロマトグラムの保持時間を決定した。このような条件に基づいて、ガラクトチュロン酸、グルコース、マンノース、ガラクトース、ラムノースおよびアラビノースの保持時間はそれぞれ約7.45, 8.04, 8.69, 8.86, 9.20および9.78分と決定された。

カリシンサンプルの加水分解物が同じ条件で分離され、糖のいくつかは以下に示すようなさまざまな量で同定された。

これらの加水分解物の液体クロマトグラフ分離は、カリシンが本質的にマンノースであることを示している。またさまざまな量のガラクトチュロン酸、グルコース、ラムノース、アラビノースおよびその他の糖がある。これらの糖のいくつかは、溶液中の量が低いためにこの方法によって正確に測定することは困難である。酢酸としてのアセチル基の存在は、大量であるが、カリシンに完全に帰属されることはできなかった。というのはこの加水分解物溶液を明確にするのに使用したメンブランフィルターがクロマトグラムにさまざまな量のアセテートを加えたものと思われるからである。グルコースはこの加水分解法によって分析されたいくつかのカリシンサンプルにおいて極めて少量であることが注目される。しかしカリシンをH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>のような酸で加水分解すると、グルコース含有量は抽出物中に存在するセルロース系物質の加水分解のためにおそらくはるかに高くなるであろう。

カリシンがほぼマンノースであるという観察はまた、この加水分解モノマーのトリメチルシラン(TMS)誘導体のガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(GC/MS)分離および同定によっても確認された。これらの手段は、マンノースが加水分解物の80%より多くを占めていることを示した。

#### 実施例 14

旋光度:

カリシンは589 ナノメートルにおけるナトリウムD線に

対して左旋性であることがわかった。ジメチルスルホキシド溶液中25%メチルホルホルリンオキシドを含む溶液に溶した1% (w/v) カリシン溶液は、室温において(-) 26°の比旋光度を与えた。この値は、25% H<sub>2</sub>OのDH80中溶液をブランクとして用いて測定された。使用した偏光計はパーキンエルマー241HCであった。

カリシンサンプルの水溶液の旋光度は、パーキンエルマー偏光計モデル241HCを用いて測定された。この測定は、589nmのナトリウムD線長において行われた。サンプルセルは、1デシメートル(dm)の光路長のものであった。方法:

全200 mgのカリシンサンプルを正確に秤量し、200 mLポリプロピレン製ビンに入れた。脱イオン水(18.6メガオーム(HQ), 100 mL)を加えて0.2% (w/v) の濃度とした。この懸濁液をラボラインオービットシューカー(Lab-Line Orbit shaker)中で12時間攪拌して完全に溶解させた(こんにゃく植物からの市販のグルコマンナンは部分的に溶解した)。

通常曇っていて粘質なカリシンの典型的な溶液を、1.2 μmのメンブランフィルター(ユニフロー#46-02380, シューリーシャー・アンド・シュネル社、キーン, NH) (Uniflow 46-02380, Schleicher and Schnell Inc., Keene, NH)を用いて濾過した。この濾液を0.45 μmのフィルター(ユニフロー#46-02340)に通して再濾過して、明確な溶液を得た。旋光度は、ブランクとして脱イオン水

(10.6HΩ)を用いて測定した。測定した旋光角は次のようにして比較旋光度に変換された。

$$\alpha = [\alpha] \frac{d}{\lambda} \frac{1}{c} \frac{1}{V}$$

$$[\alpha] \frac{d}{\lambda} = \alpha V / d$$

上記式において

$$[\alpha] \frac{d}{\lambda} = \text{比旋光度}$$

$\alpha$  = 測定された回転角

$V$  = 溶液の容積 (ml)

$d$  = 溶液セル中の活性物質の量 (g)

$t$  = 温度 (25°C)

$\lambda$  = 波長 (589 nm)

結果を表2に示す。

表 2

バッチ #	比旋光度 ± S.D.
# 1	-25.9 ± 0.6
# 3	-10.2 ± 0.5
# 4	-21.4 ± 0.5
# 613006	-14.7 ± 0.8
# 6701008	-12.7 ± 0.4
# 3B	-14.2 ± 0.7
# 5B	-9.5 ± 0.2
グルコマンナン	-19.0 ± 0.4

表 3

元 素

サンプル #	炭素	水素	酸素	窒素	硫黄	リン
バッチ #1	37.82	5.71	45.85	1.27	0.31	0.81
バッチ #2	30.33	4.67	45.16	1.15	0.34	0.74
バッチ #3	29.58	4.23	44.30	0.46	0.20	0.33
バッチ #4	39.86	5.84	46.43	0.52	0.16	0.80
バッチ #5	37.45	5.76	46.29	0.81	0.18	0.60
バッチ #6	41.72	6.11	46.14	0.84	< 0.30	0.48
バッチ #7	39.20	5.68	45.40	1.36	< 0.30	0.54
ヒルトップ	36.45	5.35	44.07	1.51	0.44	1.02
ミッチェル	41.57	5.96	43.25	1.35	0.37	0.71
TCX	33.47	5.03	44.53	1.57	0.46	1.25

バッチ #3、#4、#5および#6について窒素含有量が比較的低いことは重要である。これらのバッチは、変性アルコールからつくられた。これらの物理的な外観もまた、大多数のカリシンサンプルとは異なっていた。さらにこれらのバッチの細胞培養物応答（ヒト繊維芽細胞刺激）は平均よりかなり低かった。

## 実施例 16

発光スペクトル分析：

カリシンサンプルについて、発光スペクトル分析を行った。この分析は、コロラド州ホイートリッジのハフマンラボラトリーズ社によって行われた。銀(Ag)ないし亜鉛(Zn)

旋光度は、カリシンが左旋性であることを示している。回転角はバッチによって変化する。

上記データのすべては、カリシンがβ(1→4)結合を有するポリマーであることを示している。

## 実施例 15

元素分析：

有機化合物の元素分析は、構造を解明する際の強力な手段である。カリシンは実質的に有極性であり、従ってこの手段に従うことができる。カリシンのサンプルバッチは、元素分析のためにコロラド州ホイートリッジのハフマンラボラトリーズ社(Huffman Laboratories Incorporated in Wheat Ridge, Colorado)に送られた。炭素、炭素、水素および窒素は、カリシンの構造の80~90%を占めた。リンと硫黄は合わせて、0.5~2%を占めた。表3は報告された結果を示す。

までの68種類の元素のすべてがモニターされた。わずかに数種類の元素が検出された。これらは、カルシウム、ナトリウム、珪素、マグネシウム、マンガン、銅、クロム、バリウム、鉄およびアルミニウムであった。環境保護庁(EPA)が列挙している有毒金属、とりわけ鉛、モリブデン、コバルト、カドミウム、ヒ素、セレン、水銀は、半定量的なこの方法によって検出されなかった。

## 実施例 17

X線回折分析：

フィリップエレクトロニクスインストルメントX線回折装置を用いて、カリシンの粉末X線回折パターンが得られた。5°~60°の範囲の2θ角度が、1分当り(2θ)角度の速度でスキャンされた。放射線は、15ミリアンペアおよび35キロボルトで操作された管からの銅K<sub>2</sub>(Cu K<sub>2</sub>)であった。

X線回折分析により試験したカリシンサンプルの多くは、認められるほどの結晶性を示さなかった。カリシンは、本質的に非晶質であった。このカリシンの非晶質性は、脱アセチル化によって破壊することができ、また再水和した形のもを空気乾燥することによってわずかに分解することができる。

## 実施例 18

熱重量分析：

この技術は、温度による重量の損失の変化を測定するものである。実験室でつくられたカリシンサンプルおよび大

表 4

サンプル#	サン プル (mg)	H <sub>2</sub> O (g)	分 解 物 酸 化 可 能 残 留 総 量 炭 素 な も の (%)			(%)	(%)
			1	2	3		
606005	6.53	8.35	49.66	11.59	6.03	16.4	7.70
711009	5.60	6.55	40.08	11.49	5.50	19.09	16.74
430003	8.24	9.33	36.43	10.76	4.60	24.69	18.05
520007	10.17	10.25	38.21	10.27	3.62	25.68	17.83
701008	5.79	9.65	45.10	10.55	5.09	13.43	17.25
531004	4.96	8.02	48.94	11.14	6.38	11.90	13.99
613006	4.86	8.16	46.3	10.75	5.40	15.41	15.38
(メックス 4層)							
	8.03	8.46	26.04	11.55	3.46	31.61	25.84
(マンバッチ1)							
	9.22		58.2	12.70	4.70	3.52	10.74
(マンバッチ2 アセチル)							
	7.96	12.81	37.03	10.16	6.04	15.28	18.97
531004	7.74	5.45	66.94	6.89	3.69	15.0	2.51
こんにゃくからのグルコマンナン							
	30.6	9.82	11.32	69.83	0	17.4	0.668

規模に製造されたカリシンサンプルの両者を、メトラー熱重量分析計 TA 3000システムを用いて分析した。このシステムは、TC 10A TAプロセッサと TG50 熱天秤から構成されていた。温度範囲は室温 (25℃) ~ 750 °C であった。

カリシンは、ありうる単純な構造を推定させる単一の分解パターンを示した。分解のプロファイルは、こんにゃく植物から得られたグルコマンナンのプロファイルとは異なっていた。カリシンは50℃~210 °Cの間で表面水および結合水を失い主ピークは95℃であった。分解の大部分は210 °C~405 °Cの間で起り、ピークは325 °C付近であった。さらに406 °C~735 °Cの間で分解が起った。酸化可能な炭素は、630 °C~737 °Cで消失した。大部分区分からなる残量は、全重量の10~20%以上を占めた。表4は、カリシンのいくつかのサンプルの熱重量分析分解プロファイルを示している。

分解のプロファイルは、カリシンサンプルがそれからつくられたアロエの葉の出所にかかわらずほぼ同じであることが観察された。このプロファイルは、こんにゃく植物のグルコマンナンとはかなり異なっていた。製造されたバッチ #1は、いくつかの違いを実際に表示している。これは著しく異なったプロセスで製造されたものであるので、このことは驚くべきことでできなかった。前駆体ゲルは、カリシンがアルコールでゲルから析出される前に、珪藻土フィルターを通して濾過し明澄にされた。

#### 実施例 19

##### 密度:

カリシンの密度は、カリシンと共に析出した無炭素の量に依存して変化する。

カリシンの密度はまた、水和に高度に依存する。凍結乾燥に先立って、生成物に追加の水を加えることによって、よりふわふわした密度の低い生成物が得られる。コンシステンシーを保持するために、凍結乾燥に先立って、その製造の間にエタノール対水の比4:1 (v/v) を用いた標準的な方法により以下のサンプルを製造した。

##### 操 作:

乾燥カリシン粉末を予め秤量した10gの目盛り付きシリンドラーに入れ、次にこのシリンドラーを再び秤量して加えたカリシンの全重量を測定した。すべての重量は、メトラー AE 163分析天秤で測定された。次にこのシリンドラーをボルトテックス・ジェニー (Vortex-Genie) 攪拌機で10秒間高速で

攪拌し、次いでカリシンの体積を観察した。密度は、乾燥カリシン粉末の体積 (cc) 当たりの質量 (g) として測定した。結果を表5に示す。

表 5

バッチ	密 度
# 1	0.074
# 3	0.640
# 4	0.382
# 613006	0.150
# 701008	0.291
# 3 B	0.561
# 5 B	0.750
# 6 B	0.826
# 7 B	0.683
# 8 B	0.499
グルコマンナン	0.586

バッチ #5B からの乾燥カリシン粉末 1 g を50ccの脱イオン水に溶解した。この溶液を次に凍結乾燥した。この乾燥カリシンは、0.110 の密度を有するふわふわした白色の粉末であった。このようにバッチ #5B からのカリシンを50ccの水に再溶解し、次いでこの溶液を凍結乾燥することによって、乾燥粉末の密度は0.759 から0.110 へと変った。

## 実施例 20

## カリシンの溶解性:

カリシンは、アロエ葉の葉の出所、濾過、エタノール析出および乾燥のような処理の程度に大きく依存する変化する溶解特性を示す。カリシンの異なるバッチの水溶解性の程度が観察された。同じ濃度（重量/容量）の異なるカリシンバッチは、粘度および無機塩含有量において非常に異なった水溶液（ゾル）をつくり得る。粘度および無機塩含有量は、一般に物質の溶解度に影響を及ぼす。

この研究はカリシン製造バッチ 11 およびバッチ 12 を用いて行われた。この2つのバッチは、出所、処理およびいくつかの化学的組成の両者においていくつかの違いを持つ。水およびその他の溶媒に対する溶解度が異なりうる。使用した溶媒は、水、アセトン、ジメチルスルホキシド(DMSO)、テトラヒドロフラン(THF)、0.9%塩化ナトリウムおよび0.1%安息香酸ナトリウムであった。

## 方法:

全部で18本のポリプロピレン製の試験管を立てた。6本はそれぞれのカリシンバッチ用であり、残りの6本の試験管は溶媒ブランク用のものであった。

サンプル管のそれぞれに0.04gのカリシンを秤量し加えた。溶媒10mlを加えて0.4%(w/v)混合物をつくった。この混合物を室温で5時間攪拌した。この懸濁液を遠心分離管に移し、1,500rpmで50分間遠心分離した。溶媒ブランクも同様に処理した。

## 結果:

カリシンは、水および水溶液において、試験を行ったその他の溶媒におけるよりも溶解性が高かった。

水性媒体における高粘度と他の溶媒中のカリシンの極めて低い溶解性との間の妥協として濃度0.4%(w/v)を選んだ。カリシンを約0.5%(w/v)まで水に溶解させることが可能である。

## 実施例 21

## 粘度

キャノン フェンスケ型粘土形（モデル150，ニュージャージー，ユニオン，インダストリアル・リサーチ・グラスウエア社）(Cannon-Fenske type Viscometer (Model 150, Industrial Research Glassware Ltd., Union, NJ))を用いて40℃で粘度の測定を行った。粘度計にカリシンの0.2%水溶液(0.05%  $N_2$   $N_3$ )を入れて、水浴（モデル88G-1090，ブルーM，エレクトリック社ブルーアイランド，イリノイ）で10分間暖めた。次に製造業者の指図書に従って、溶液の流れを最少0.1秒まで観察した。キャリアレーションファクターは、40℃で0.04197センチストークス/秒であった。

結果を表7に示す。

溶液を固体からデカントした。溶液および固体（析出物）の両者を、完全に乾燥するまで50℃より低い温度のオーブンで乾燥した。乾燥した固体を秤量した。析出物を生じた溶媒フラスコも秤量した。この重量をサンプルの重量から差し引いた。

表 6

溶 媒	バッチ No.	デカント した溶液 (gm/100ml)	析出物 (gm/ 100ml)	合計 (gm/ 100ml)
水(H <sub>2</sub> O)	1	0.338	0.080	0.418
	2	0.384	0.035	0.419
アセトン	1	0.0	0.365	0.365
	2	0.0	0.353	0.353
ジメチル スルホキシド	1	0.282	0.125	0.407
	2	0.202	0.208	0.410
テトラヒドロ フラン	1	0.04	0.358	0.398
	2	0.04	0.351	0.391
0.9%塩化 ナトリウム	1	0.376	0.041	0.417
	2	0.418	0.019	0.437
0.1%安息香酸 ナトリウム	1	0.354	0.083	0.437
	2	0.342	0.026	0.368

表 7

バッチ	粘度 (センチストークス)
1	6.10
3	1.18
4	5.09
613006	2.12
C701008	2.08
3B	2.02
5B	4.53
6B	1.75
7B	1.55
8B	1.97

## 実施例 22

## カルシウム濃度：

アロエベラ活性におけるカルシウムの機能は完全に解明されてはいないが、アロエベラゲルの品質は時々カルシウムおよびマグネシウムの含有量に基づいている。カリシンはアロエベラゲル中の活性物質であるので、カルシウム含有率が測定された。

カリシンの合計カルシウムは、カルシウム・ラピッド・スタート・キット（ランサー・メディカル・セントルイス，MO）（Calcium Rapid Stat Kit (Lancer Medical, St. Louis, MO)）を用いて分光学的に測定した。0.2%カリシン水溶液（0.05 %  $\text{Na}_2\text{N}_3$ ）の50 $\mu\text{L}$ のサンプルを3.0 $\text{mL}$ の試験管に加え、青いカルシウム・メチルチモールコンプレックスをIBH モデル9420 UV - 可視分光光度計を用いて612 nmで測定した。

結合カルシウムは、次の経酸的方法により測定した：

0.2%カリシン水溶液（0.05 %  $\text{Na}_2\text{N}_3$ ）の25 $\text{mL}$ のサンプルを透析バッグの中に入れ、18.6H  $\Omega$ の脱イオン水10リットルに対して室温で1晩透析を行った。次にバッグの内容物を凍結乾燥フヤーに移し、凍結乾燥した。乾燥粉末を秤量し、次に20%硝酸、10%塩酸溶液中で80℃で1晩処理した。サンプルを、原子吸光分光分析によりカルシウムを測定するためにテキサス州デントンのトラックラボラトリー（Trac Laboratories）に送った。

注： 上記操作におけるすべての容器は、ナルゲン

（Nalgene）すなわちポリプロピレン製であり、1.0M

HCl および脱イオン水（18.6H  $\Omega$ ）で十分に洗浄したものである。

結果を表8に示す。

表 8

パッチ	合 計 カルシウム (%) (乾燥カリシン)	結 合 カルシウム (%) (乾燥カリシン)	凍結乾燥した 固体の重量 (mg)
1	3.7	0.042	31.7
3	10.15	0.086	12.9
4	2.15	0.048	32.0
613008	6.05	0.080	20.6
6701008	6.65	0.088	23.9
3B	6.50	0.074	20.7
5B	3.55	0.074	29.6
グルコマンナン	無視できる		

## 実施例 23

核磁気共鳴スペクトル (NMR)：

NMR は、分子構造を解明する際に必須の強力な手段である。NMR スペクトルは、化学シフトのための参照標品（テトラメチルシランなど）を用いてキャリブレーションされる。

NMR 分光分析に一般に使用されるいくつかの溶媒（ $\text{D}_2\text{O}$ 、 $\text{DMSO}$ 、アセトン- $\text{D}$ など）におけるカリシンの固有の低溶解度ならびに高粘度の故に、この手法はカリシン溶液において成功しなかった。

しかし固体としてのカリシンの極めたスペクトルがクロスポーラリゼーション・マグニチュード・マッピング (CP-MAS) 手法を用いて得られた。固相カリシン C-13 NMR スペクトルが得られた。このスペクトルはIBH 分光計ならびにこのIBH NMR 分光計に付属しているいくつかの特別の付属品を用いて得られた。このスペクトルによれば、分析されたカリシンの C-13 NMR のピークは、外部参照標品としてのテトラメチルシラン (TMS) に対する化学シフトに関し、20.54, 60.39, 71.33, 100.75, 171.78 および 180.75ppm に位置された。

推定的これらのピークは次のように帰属される：20.54 ppm ( $\text{CH}_3\text{COH}$ , または  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ )；60.39 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ )；71.35 (C-2, C-3, および C-4 および C-5 炭素)。この帰属はこの特定のピークの大きさから見てたぶん正しい。100.75ppm のピークは (C-1 グリコシド) によるのであろう (aag be)。

171.78 のピークは  $\text{COOH}$  のものと期待されるよりわずかに低いが、分子の配向に依存しているのであろう。最後の 180.75ppm のピークはカルボニルカーボン ( $\text{C=O}$ ) である。C-1 (還元末端) に相当する約95ppm のいくつかの小さなピークも観察された。フラノシル単位の C-1 を

示すかも知れない 106 - 109ppm の間のいくつかのピークが欠落していることは重要である。

これらの帰属は、 $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) マンナンの構造と一致している。

## 実施例 24

赤外線分光分析：赤外分光分析は、カリシンの固相および特徴づけに有効であった。IBH IR/32 フーリエ変換赤外分光光度計が、この手法のために用いられた。この装置はソフトウェアとHe-Ne レーザーによって波長に対して自己校正する。これは、ポリスチレンフィルムの標準スペクトルによって証明することができる。シグナル対ノイズ比が小さい場合には、時には光学的な調節が必要とされる。

カリシンを粉砕して粉末にし、赤外グレードの臭化カリウム (KBr) 粉末と混合する。この混合物をプレスして透明なディスクにし、赤外光でスキャンすることができる。

KBr ディスクよりも優れたスペクトル分解能を示す 0.2% (w/v) カリシン水溶液の透明なフィルムを作成する新しい手法が開発された。カリシンを4000 $\sim$ 400  $\text{cm}^{-1}$ でスキャンするとスペクトルにおいて次の官能基が観察された：

(O-H) 結合水素の伸縮振動数による3800 $\sim$ 3200  $\text{cm}^{-1}$  および関連する1100 $\sim$ 1050  $\text{cm}^{-1}$  の曲げ振動。2950 $\sim$ 2800  $\text{cm}^{-1}$  の伸縮振動および対応する曲げ振動1470 $\sim$ 1460  $\text{cm}^{-1}$  は、C-H 基であった。他の観察された主な官能基は次の通りであった：

(1)  $\text{COO}^-$  単位；その非対称および対称振動はそれぞれ



表 9

- れ1600~1550 $\text{cm}^{-1}$ および1450~1400 $\text{cm}^{-1}$ の間に認められた。
- (2) エステル基(COOR) : その伸縮振動は1746~1735 $\text{cm}^{-1}$ および1250~1240 $\text{cm}^{-1}$ の間に観察された。
- (3) アミド基(CONH) : そのアミドIの伸縮振動およびアミドIIの曲げ振動はそれぞれ1650~1645および1550~1540 $\text{cm}^{-1}$ 付近に観察された。表9には、およその振動数(波数)、対応する官能基および振動モードが附示されている。

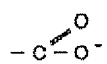
ピーク#	波数( $\text{cm}^{-1}$ )	官能基	振動モード
1	1100 - 1035	O-H, C-O-C	V(O-H) V(O-H)
2	3430 - 3390	O-H	V(O-H)
3	2930 - 2800	C-H	V(C-H)
4	1470 - 1380	C-H	$\delta$ (C-H)
5	1600 - 1550	COO <sup>-</sup> , 	V(C=O) 非対称
6	1450 - 1400		V(C=O) 対 称
7	1420 - 1410	C-O	
8	1650 - 1645	CONH	Vアミド I C=O
9	1550 - 1540	CONH	Vアミド II
10	1746 - 1735	COOR	V(C-O)
11	1250 - 1240	COOR	V(C-O-C)
12	980 - 950	C-O, O-CH <sub>2</sub>	

表10は種々のカリシンサンプルのピークの吸収極大が表9のピークの帰属といかに一致しているかを示すために下記に示される。

表 10

カリシン531004 <sup>1</sup> ( $\text{cm}^{-1}$ )	カリシンヒルトップ ( $\text{cm}^{-1}$ )	カリシンバッチ12 ( $\text{cm}^{-1}$ )
1591.5	1068.7	1585.7
3414.4	1037.8	3400.9
1072.6	3420.2	1086.1
1246.2	1244.2	1425.6
1740.0	1734.2	1037.8
1431.4	1635.8	1244.2
603.8	1653.2	1740.0
2930.2	1375.4	605.7
806.3	472.6	679.0
	1419.6	2920.3
	1558.7	545.9
	605.7	956.8
	2924.4	806.3
		879.6

この赤外分析によれば、カリシンはいくつかの酸、エステル(O-アシル/N-アシル)官能基側鎖を有する多分岐ヘテロポリサッカライドであると思われる。カリシンサンプルは、完全にO-アセチル化され、また脱アセチル化された。アセチル化されたカリシンサンプルのカルボニル官能基およびC-O-C伸縮は、それぞれ1746 - 1735 $\text{cm}^{-1}$

と1246 - 1235 $\text{cm}^{-1}$ の間に観察された。脱アセチル化されたカリシンサンプルのカボキシレートカルボニル伸縮は、次のようにそれぞれ1600~1550 $\text{cm}^{-1}$ と1450~1400 $\text{cm}^{-1}$ の間に位置された：

表 11

カリシン531004 ( $\text{cm}^{-1}$ )	カリシン531004 (脱アセチル化) ( $\text{cm}^{-1}$ )	カリシン531004 (アセチル化) ( $\text{cm}^{-1}$ )
1591.5	1431.4	1244.2
	(1560 - 1339)	
3414.4	3400.9	1741.9
1072.6	1032.0	1064.8
1246.2	1062.9	3460.7
1740.0	1091.8	1375.4
1431.4	875.8	1647.4
603.8	1147.8	1433.3
2930.2	1645.5	2932.2
806.3	2924.4	1541.3
	814.1	956.8
	615.4	603.8

カリシンが脱アセチル化されたとき、1246~1235 $\text{cm}^{-1}$ の間のエステルC-O-Cの伸縮振動がないことが観察され

表 12

た。スペクトルの最大のピークは $1431\text{cm}^{-1}$ に中心があることも認められた。カリシンのアセチル化/脱アセチル化の程度は、これらの2つのピークによって観察することができる。実際、この実施例においてはアミドIが約 $1646\text{cm}^{-1}$ に観察されるので、 $1431\text{cm}^{-1}$ のピーク ( $1560 - 1339\text{cm}^{-1}$ ) がアミドIIのピークと混じっていた。

## 実施例 25

## 生物活性:

生体および生体外実験の両者によってカリシンが繊維芽細胞の増殖を促進することが観察された。対照に比べて2~3のファクターでの促進が、場合により記録された。表12は、0.1% (w/v) の濃度のカリシンによって72時間に亘る時間で影響を受けた繊維芽細胞増殖カウントンを示している。

サンプル	濃度 (w/v)	24時間 %	48時間 %	72時間 %
TCX ラボ7/25/85				
	0.1	90.7	102.2	163.8
バッチ1 (TCX)	0.1	104.3	130.7	120.5
バッチ2	0.1	72.1	123.2	144.9
バッチ3	0.1	75.5	130.9	120.4
バッチ4	0.1	102.3	131.2	135.1
バッチ5	0.1	79.3	115.0	129.2
バッチ6	0.1	57.7	130.9	113.3
バッチ7	0.1	65.1	110.6	120.2
バッチ (ラボ)				
5/83	0.1	81.1	138.3	169.7
マンバッチ1B	0.1	125.6	174.8	114.8
マンバッチ2B	0.1	103.5	175.3	110.6
マンバッチ3B	0.1	138.9	156.4	147.0
マンバッチ3B				
(水和物)	0.1	103.3	141.3	158.9
グルコマンナン	0.1	103.3	69.9	108.6
(こんにゃく植物)				
対照SCH	0.1	100.0	100.0	100.0

これらの実験は、種々の条件下で作成されたカリシンの種々のサンプルに対する細胞の応答を評価するために行われた。

## 実施例 26

## アセチル基分析:

一連の異なったカリシンバッチ中のO-アセチル基の量を測定した。分析に先立ちサンプルを真空オープン中40℃で $\text{P}_2\text{O}_5$ により1晩乾燥した。次に脱イオン水を用いて約1mg/mlの溶液をつくった。使用した分析操作は、第二鉄-アセトヒドロキサム酸コンプレックスの比色測定を含むヘストリン (シュロモヘストリン, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (1949), 180, 249-251) (Shiono Hestrin, J. Biol. Chem. (1949) 180, 249-251) によって述べられた操作と同じであった。

結果は次の通りである:

表 13

サンプル	カリシン1g当りのアセチル基 のミリモル数
1	3.72
3	1.30
4	4.15
3B	2.11
4B	0.23
5B	3.33
6B	2.28
8B	2.32
10B	1.68
531004	2.97
613006	2.77
701008	2.61
完全アセチル化 (531004)	5.69
8B>100K	3.93
8B 10K - 100K	2.90
3B 3K - 10K	0.10
3B<3K	検出されなかった
メチル化8B	検出されなかった

同じ日に測定した8個の0.1%のカリシン溶液の72時間における相対活性値(緑葉芽細胞刺激)とアセチル化の表は以下の通りである。

表 14

バッチ No	カリシン1g当りのO- アセチル基のミリモル数	活 性 (%)
613006	2.7700	136.0000
701008	2.6100	95.5000
1	3.7200	113.2000
3	1.3000	93.9000
4	4.1500	104.7000
3B	2.1100	111.7000
4B	0.2300	74.4000
5B	3.3300	100.7000

このデータは、カリシンの活性がカリシン1g当りのO-アセチル基の量に直接比例していることを示唆している。これは、意くべき予想されなかった結果である。

9個のカリシンサンプルの粘度値(センチストークス)とアセチル化の表は次の通りである：

バッチ No	カリシン1g当りのO- アセチル基のミリモル数	粘度(センチ ストークス)
1	3.7200	6.1000
3	1.3000	1.1000
4	4.1500	5.0900
613006	2.7700	2.1200
701008	2.6100	2.0800
3B	2.1100	2.0200
5B	3.3300	4.5300
6B	2.2800	1.7500
8B	2.3200	1.9700

このデータは、粘度がカリシンのアセチル化度に指数関数的に比例していることを示している。上記データから最もよく合う次の直線が決定された：

粘 度 =

$$0.496 \times e^{(0.604 \times \text{アセチル基ミリモル数} / g)}$$

#### 実施例 27

次の実験は、テキサス州ハーリンゲンのヒルトップガーデンから得たアロエの葉を用いて行なわれた。この葉を、洗浄、切断、フィレット化、粉碎、均質化(1500psi)および濾過(バルブ濾過媒体)により処理した。全プロセスを1時間20分未満で完了した。

#### パート I

午前9時10分に3リットルのゲルと12リットルの190ブルーフ未変性エタノールを5ガロンのポリプロピレンボトル中で激しく混合した。このプロセスは、合計6リットルのゲルと24リットルのエタノールを用いて2回行なった。この混合物5リットルを、それぞれ1時間、2時間、4時間、8時間および10時間というラベルを貼った5個のステンレススチール製のパンのそれぞれに素早く移した。もう1つのパンは24時間の試験のために使用された。

例えばアルコールを加えた時刻から1時間経過した時、1時間というラベルを貼ったサンプルをアルコールをサイフォンで抜き取ることによって濃縮し、次いで遠心分離した。固体を新しいアルコールで洗浄し、これを遠心分離板にデカントした。固体析出物を凍結乾燥ボトルに入れ、液体窒素中で素早く凍結し、凍結乾燥を行った。アルコールを除き凍結乾燥工程に送るプロセスは平均50~60分間であった。それぞれのラベルした部分を同じ様に処理した。

#### 表 16 パート I の研究

サンプル No	時 刻 (凍結乾					
	時 刻	湯機に	乾燥重量	収 量	収 率	
時 間		入れた)	( g )	( g / l )	( w/v )	
1	10:10a.m.	11:15a.m.	.7178	.7175	.0718	
2	11:10a.m.	12:10p.m.	.7643	.7643	.0764	
4	1:10p.m.	2:15p.m.	.7748	.7748	.0775	
8	5:10p.m.	6:10p.m.	.7903	.7903	.0790	
10	7:10p.m.	7:40p.m.	.8147	.8147	.0815	
24	9:10a.m.	10:05a.m.	.9373	.9373	.0937	

#### パート II

パート II の研究は、精製アロエゲルを時刻の研究に付した点においてパート I と異なっている。X時間において(Xはそれぞれ0, 1, 2, 4, 8および10時間である)。2リットルの精製ゲルを8リットルの190ブルーフ未変性アルコールと混合した。混合物を攪拌し、アルコールをサイフォンおよび遠心分離によって除去する前に4時間沈降させた。固体析出物をパート I に述べたように処理した。

表 17 - パートIIの研究について

サンプル (時間)	0	1	2	4	8	10
時刻	9:10am	10:10am	11:10am	1:10pm	5:10pm	7:10pm
時刻(アル コールを除去 するまで)	1:10pm	2:10pm	3:10pm	5:10pm	9:10pm	— 夜
時間(アル コールの時間)	4	4	4	4	4	—
時刻(凍結乾燥 機に入れた時刻)	2:20pm	3:10pm	4:10pm	6:15pm	9:35pm	—
乾燥重量(g)	1.4894	1.4752	1.4083	1.3443	1.4957	1.3324
収 量 (g/ゲル量)	.7447	.7376	.7042	.6722	.7476	.6662
収率(w/v)	.0745	.0738	.0704	.0672	.0748	.0668

カリシンの時間経過研究の試験

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) :

カリシンの平均分子量分布は、サイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography) (SEC) によって測定された。液体クロマトグラフは、HP 79875 A UV - VIS 検出器の自動サンプラー79841Aおよびバイオランドモデル1770屈折率検出器を特徴とするヒューレットパッカードモデル1084Bであった。このカラムはスフェロゲル (Spherogel) を充填したベックマン充填カラム 7.5×300 mm (TSK 2000sw; パートNo.244282, シリアルNo.5K526)であった。移動相は、0.05 % (w/v) アジ化ナトリウム溶液で、流速 0.5ml/分、温度30℃であった。ミズーリ州セントルイスのシグマケミカル社のデキストラン標品を用いて、次のように平均分子量分布を決定した:

デキストランNo	ロットNo	平均分子量	(分)
D-5376	24F-0298	2,000,000	11.21
D-1390	13F-0427	71,200	11.49
D-4133	114F-0335	40,600	11.84
D-9260	53F-0240	9,000	17.71

同じ条件をカリシンの分離に適用すると次に示す3つの主要なピークが観察された。

ヒルトップ(凍結乾燥)フィレット:

画分No	保持時間(分)	%合計	% (3画分)
1	10.07	10.20	12.2
2	18.38	17.73	21.1
3	22.48	56.02	66.7

ヒルトップインスタントプロセス(短時間):

画分No	保持時間(分)	%合計	% (3画分)
1	11.05	43.14	46.8
2	18.57	19.74	21.4
3	22.05	29.24	31.7

ヒルトップパートI (1時間):

画分No	保持時間(分)	%合計	% (3画分)
1	11.52	50.30	54.6
2	16.28	14.04	15.2
3	21.99	27.71	30.1

ヒルトップパートII (4時間):

画分No	保持時間(分)	%合計	% (3画分)
1	11.79	56.42	58.3
2	16.33	15.30	15.8
3	21.08	25.07	25.9

ヒルトップパートI (10時間):

画分No	保持時間(分)	%合計	% (3画分)
1	11.14	57.73	60.4
2	16.37	14.66	15.5
3	22.03	22.44	23.7

ヒルトップパートI (24時間):

画分No	保持時間(分)	%合計	% (3画分)
1	11.41	45.75	50.5
2	16.55	19.35	21.4
3	21.28	25.43	28.1

初期につくられたカリシンサンプルを上記と同じ条件で分離すると、3つの大きな画分がまた観察された。

TCX製バッチ#1

画分No	保持時間(分)	%合計	% (3画分)
1	11.18	35.10	36.98
2	16.12	7.04	7.40
3	22.29	52.91	55.60

メキシコ製バッチ#2

画分No	保持時間(分)	%合計	% (3画分)
1	11.04	19.02	19.0
2	16.46	24.27	24.3
3	22.38	56.70	56.7

デキストラン標品を基準にして、カリシンの3つの画分の平均分子量分布は次のようであった。

画分 # 1 > 80,000

# 2  $\geq$  10,000

# 3 < 1,000

デキストランとカリシンのポリサッカライドは物理的および化学的に異なるので、平均分子量分布のみを決定することができる。例えば、サイズの分離は溶媒間のイオンチャージ吸着および/または分配のような他の因子によって影響される。

カリシンのカルシウム含有量：

アロエの活性におけるカルシウムの機能は完全には解明されていないけれども、このパラメーターもカリシンにおいて観察された。カリシンのカルシウム含有量は、血清や尿中のカルシウムの定量比色測定に一般的に使用されているランサー・カルシウム・ラピッド・スタート・キットによって測定された。形成された濃い青色のカルシウム-メチルチモールブルーコンプレックスを612 ナノメーターで読み取る。この実施例においては、吸光度の測定に18H UV/VIS分光光度計モデル9420が使用された。3点のカルシウム標準に基づいて、カリシンのカルシウム含有量が次のように決定された。

#### パート I

サンプル # (アルコール中の時間)	カルシウム % (w/w)
0	N/A
1	4.58
2	5.03
4	5.06
8	5.06
10	5.39
24	5.40

#### パート II

サンプル # (アルコール浸漬前の時間)	カルシウム % (w/w)
0	4.26
1	4.00
2	4.55
4	4.48
8	4.69
10	4.04

#### 赤外分析

分析手法としての赤外(IR)分光分析は、水性媒体中における粘度が、膜を必要とするすべての分析において問題を与えるカリシンの分析においては特に重要である。

カリシンの赤外分析は、その官能基を測定するために行われた。使用した装置は、18H フーリエ変換赤外 (FT-IR) 分光計モデル32であった。この装置の状態は、分解能 = 4 ; スキャンの数 = 32 ; 検出器 = DTGSであった。

カリシンは粉末であるので、赤外グレードの臭化カリウム (KBr) 粉末と容易に混合でき、この混合物をプレスしてディスクにすることができる。次にこのディスクをスキャンする。しかし 0.2% (w/v) カリシン水溶液の透明なフィルムを作成する新しい技術が開発された。このフィルムは、KBr ディスク法よりも優れたカリシンの赤外スペクトルを与える。カリトンを  $4000\text{ cm}^{-1}$  から  $400\text{ cm}^{-1}$  までスキャンすると、次の特徴的な吸収振動が観測された：

表 18

ピーク #	波数 ( $\text{cm}^{-1}$ )	官能基	振動モード
1	1100 - 1035	O-H	
		C-O-C	$\delta$ (O-H)
2	3430 - 3390	O-H	V (O-H)
3	2930 - 2800	C-H	V (C-H)
4	1470 - 1380	C-H	$\delta$ (C-H)
5	1600 - 1550	COO <sup>-</sup> , -C< <sup>O</sup> / <sub>O</sub> -	V (C-O) 非対称
6	1450 - 1400		V (C-O) 対 称
7	1420 - 1410	C-O	
8	1650 - 1645	CONH	アミド I C-O
9	1550 - 1540	CONH	アミド II $\delta$ (N-H)
10	1746 - 1735	COOR	V (C=O)
11	1250 - 1240	COOR	V (C-O-C)
12	980 - 950	C-O, O-CH <sub>2</sub>	

上記の特徴的な赤外振動数を用いてパート I およびパート II における研究の振動数の吸収極大は次の通りであった：

表 19

パートII

パートIおよびIIのIRピーク恒大放散#S (cm <sup>-1</sup> )					
強度の順に配列した					
	1時間	4時間	8時間	10時間	24時間
1	1074.5	1068.7	1068.7	1587.6	1068.7
2	1039.8	1037.8	1037.8	3370.1	1037.8
3	3393.2	3412.5	3412.5	1076.4	3408.6
4	1589.5	1242.3	1244.2	1037.8	1242.3
5	1425.8	1740.0	1738.1	1421.7	1591.5
6	1244.2	1373.5	1375.4	1246.2	1375.4
7	1738.1	1637.8	1635.8	2042.9	1421.7
8	803.8	1423.6	1425.6	1738.1	1738.1
9	2926.4	603.8	601.9	603.8	669.4
10	2039.0	2924.4	2924.4	2920.3	2924.4
11	960.7	960.7	958.7	960.7	603.8

					O時間半
1	1074.5	3397.1	1072.6	1068.7	1068.7
2	3393.2	1072.6	1037.8	3408.6	1037.8
3	1593.4	1593.4	3404.8	1244.2	3420.2
4	1244.2	1560.6	1244.2	1734.2	1244.2
5	1419.8	1244.2	1597.3	1635.8	1734.2
6	1734.2	1419.8	1558.7	1053.2	1635.8
7	2039.0	1738.2	1419.8	1375.4	1653.2
8	638.5	2924.4	1375.4	2922.5	1375.4
9	474.5	472.6	1740.0	472.6	472.6
10	2927.4	607.7	605.7	1558.7	1419.8
11	960.7	960.7	869.4	1419.8	1558.7
12	873.9	875.8	2924.4	1541.3	805.7
				603.8	2924.4
					541.3

カリシン、脱アセチル化カリシンおよびアセチル化カリシンの先の赤外スキャンから、カルボキシレートカルボニル結合およびエステルカルボニルの振動が同定された。アセチル化カリシンのカルボニル官能基とC-O-C伸縮はそれぞれ1748-1735cm<sup>-1</sup>および1246-1235cm<sup>-1</sup>の間に発出された。脱アセチル化カリシンのカルボキシレートカルボニル伸縮はそれぞれ1800-1550cm<sup>-1</sup>および1450-1400cm<sup>-1</sup>

の間に発出された。

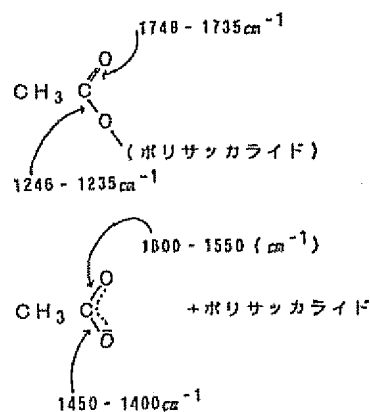


表 20

カリシン531	カリシン531 (脱アセチル化)	カリシン531 (アセチル化)
1591.5	1431.4	1244.2
3414.4	3400.9	1741.9
1072.6	1032.0	1064.8
1246.2	1082.9	3460.7
1740.0	1091.8	1375.4
1431.4	875.8	1647.4
603.8	1147.8	1433.3
2930.2	1645.5	2932.2
808.3	2924.4	1541.3
958.7	814.1	956.8
879.6	615.4	803.8

カリシンを脱アセチル化すると、1248-1235cm<sup>-1</sup>のエステルC-O-C伸縮振動の不存在が観測された。スペクトルの最大のピークは1431cm<sup>-1</sup>を中心としていることがわかった。カリシンのアセチル化/脱アセチル化の程度は、これらの2つのピークによって決定することができる。実際この実施例において、1431cm<sup>-1</sup> (1560-1339cm<sup>-1</sup>)のピークは、アミドIが1646cm<sup>-1</sup>に観測されるので、アミドIIのピークと混じっていた。

しかし、表21はパートIとパートIIの研究のこれらの2

つのピークの吸収化を示している。

表 21

サンプルNo	1450 - 1400	12400 - 1240	吸 収
時 間	( $\text{cm}^{-1}$ ) 吸収	( $\text{cm}^{-1}$ ) 吸収	比
パート I			
1	.505	.584	.998
2	.607	.600	.986
4	.289	.487	1.605
8	.289	.450	1.557
10	.387	.326	0.842
24	.248	.308	1.242
パート II			
0	.278	.475	1.709
1	.496	.513	1.034
2	N/A	N/A	N/A
4	.452	.497	1.10
8	.437	.524	1.20
10	.291	.436	1.498

約35ガロンのアロエベラゲルを上記特徴付けの研究のために処理した。洗浄から経過までのプロセスは約1時間20分継続した。この研究は、この時間内にゲルの脱酸し得る

に理解されるように、各サンプルのスペクトルは約1750の波数から約1250の波数までに5〜7個のよく分離されたピークを示している。実施例24において議論したように、これらのピークは次の官能基を示している： $\text{RCOO}^-$ 、 $\text{R}-\text{NHCOOCH}_3$  および  $\text{R}-\text{OOCCH}_3$ 。カリシンにその活性を与えていると考えられるものはこれらの官能基である。また第8図〜第13図は、本発明のプロセスによってアロエ バルバデシス ミラーの植物の葉から一定のカリシン製品が製造されることを示している。

#### 実施例 29

第14図フィルムにキャスト成形した原料アロエベラゲルの赤外スペクトルを示している。このスペクトルも、約1750の波数から約1250の波数までに5〜7個のよく分離されたピークを示している。従って第14図は、カリシンがアロエベラ植物からの原料ゲル中に存在しているという疑問を提供するものである。

#### 実施例 30

第15図はカリシンの1つのサンプルの赤外スペクトルを示している。注目されるように、1750の波数と1250の波数の間に特徴的なよく分離されたピークがほとんど無い。このカリシンのサンプルは再使用アルコールを用いてアロエベラゲルまたはジュースから析出されたものであり、これがカリシンの析出を何らかの理由で低くしたと考えられる。

#### 実施例 31

第16図および第17図は、アロエジュースの製造後に実用

分解が起こらないことを示した。

アルコール析出工程は、製造されたカリシンの品質における重要な因子であることが示された。カリシンの収率はアルコール中での沈殿時間が長くなるに従って増加するが、製造されたカリシンの品質は細胞増殖のために理想的ではないようである。アルコール中での4〜5時間の時間が、好ましくない分解を伴うことなく良好な収率をあげるために最適であると考えられる。

パートIIの研究において、もしアルコール析出が直ちに行われるなら、カリシンの収率は最大であることが認められた。もしアルコールが4時間以内に加えられるなら、細胞に対する悪影響や赤外スペクトルの変化はほとんど認められなかった。

赤外分光分析は、製造されたカリシンの品質を決定するための最も優れた手法を提供しうる。この赤外スペクトルは、特徴的な強いエステルカルボニル吸収ピークを与えるが、脱アセチル化カリシンはこのようなピークを与えない。脱アシル化の程度はこの手法により決定することができる。この手法の唯一つの問題は、アミドの存在がカルボキシレートの吸収ピークの値に影響を与えることがあるということである。

#### 実施例 28

第8図〜第13図は本発明のプロセスによってアロエ バルバデシス ミラー植物から得られた6種類の異なるカリシンのサンプルの赤外スペクトルを示している。容易

的に可能な限り迅速にアルコールを用いてアロエジュースからカリシンを抽出することが重要であることを示している。第16図は、アロエジュースを製造した1時間後にアロエジュースからアルコールを用いて抽出されたカリシンサンプルのスペクトルである。第17図は、アロエジュースを製造した10時間後にアロエジュースからアルコールを用いて抽出されたカリシンサンプルのスペクトルである。1750の波数と1250の波数の間の特徴的なよく分離されたピークは、第16図のスペクトルにおいて第17図のスペクトルと比較して有意に高い吸収レベルを示している。従って、アロエジュースからアルコールを用いてカリシンがより早く抽出されるほど、製造されるカリシンの品質がよくなるものと思われる。

#### 実施例 32

第18図〜第20図は以下の表22に示したデータからつくったものである。

表 22 いくつかの製造されたカリシンバッチの製造の際の  
の種々のプロセスに要した時間

バッチ	製造日	葉処理 時間 (分)	均質化 時間 (分)	濾過 時間 (分)	アルコール 添加時間 (分)
1	8/ 6/85	75	8	152	15
2	8/23/85	270	15	90	6
3	9/18/85	404	21	225	60
4	9/20/85	242	29	240	60
5	9/23/85	269	27	245	60
6	9/26/85	375	30	255	60
7	10/ 1/85	200	15	60	60
1B	11/25/85	72	15	14	--
2B	12/ 3/85	41	20	12	--
3B	12/17/85	73	18	149	--
4B	1/ 7/86	137	28	364	15
5B	1/10/86	148	30	63	10
6B	1/24/86	113	25	105	--
7B	2/ 5/86	91	25	25	13
8B	2/18/86	143	26	44	13
9B	2/26/86	103	32	29	15
10B	3/18/86	119	75	104	15

表 22 続き

バッチ	沈殿 時間 (分)	I/Y ppt $\times 10^4$ (分)	沈殿前の 全時間 <sup>1</sup> (分)	I/Y total $\times 10^3$ (分)
1	1210	8.28	255	3.92
2	1095	9.13	384	2.60
3	790	12.7	700	1.43
4	790	12.7	535	1.87
5	870	11.5	526	1.90
6	660	15.2	695	1.44
7	1035	9.68	345	2.90
1B	283	35.3	117	0.54
2B	375	26.7	76	13.16
3B	270	37.0	252	3.97
4B	960	10.4	542	1.85
5B	250	40.0	255	3.92
6B	250	40.0	253	3.95
7B	285	35.0	144	8.94
8B	227	44.1	230	4.35
9B	240	41.7	187	5.90
10B	255	39.2	185	5.41

表 22 続き

バッチ	均質化および 濾過の合計 時間 <sup>2</sup>	I/Y gel $\times 10^3$ (分)	収 量 (g)	収率% (w/v)
1	160	6.3	36.7	0.054
2	105	9.5	80.0	0.108
3	246	4.1	71.1	0.075
4	269	3.7	22.0	0.023
5	272	3.7	17.8	0.018
6	285	3.5	15.3	0.016
7	81	12.3	88.7	0.098
1B	29	34.5	34.3	0.085
2B	32	31.3	13.8	0.041
3B	167	6.0	177.3	0.117
4B	392	2.6	91.8	0.054
5B	93	10.8	145.0	0.096
6B	130	7.7	120.3	0.074
7B	50	20.0	184.9	0.122
8B	70	14.3	109.8	0.073
9B	61	18.4	188.7	0.125
10B	179	5.6	151.5	0.160

注1：はじめのアロエの葉を切断してから、アルコールの最初の1滴が得られたゲルに加えられるまでの全時間。

注2：ゲルの均質化および濾過のみに要した全時間。

第18図に示すように、カリシンの収量はゲルがアルコール中に存在する時間と関係があるとは思われない。第19図に示すように、カリシンの収率は折出前の全処理時間に逆比例している。第20図に示すように、カリシンの収率は均質化と濾過の時間に逆比例している。従って、カリシンの収率を最大にするためには折出前の全処理時間、より具体的には均質化と濾過の時間をできる限り短くすべきである。

#### 実施例 33

第21図は、アロエ フェロックスからのジュースのアルコール析出生成物の赤外スペクトルを示している。このスペクトルは約1750の波数から約1250の波数にかけていくつかのよく分離されたピークを示している。従って、アロエ フェロックスからのジュースのアルコール析出生成物は、カリシンと同様の活性をもつであろう。

#### 実施例 34

第22図は、アロエ アフリカーナからのジュースのアルコール析出生成物の赤外スペクトルを示している。このスペクトルは約1750の波数から約1250の波数にかけていくつかのよく分離されたピークを示している。従って、アロエ アフリカーナからのジュースのアルコール析出生成物はカリシンと同様の活性をもつであろう。



**実施例 35**

第23図は、アフリカーナ フェロックスすなわちアロエ フェロックスとアロエ アフリカーナの雑種からのジュースのアルコール析出生成物の赤外スペクトルを示している。このスペクトルは約1750の波数から約1250の波数にかけていくつかのよく分離されたピークを示している。従ってアフリカーナ フェロックスからのジュースのアルコール析出生成物はカリシンと同様の活性をもつであろう。

**実施例 36**

第24図は、アロエ ディコトーマからのジュースのアルコール析出生成物の赤外スペクトルを示している。このスペクトルは約1750の波数から約1250の波数にかけていくつかのピークを示している。アロエ ディコトーマからのジュースのアルコール析出生成物はカリシンと同様のいくつかの活性をもつであろう。

**実施例 37**

第25～29図は、セルロース、ポリガラクトuron酸、こんにゃく植物からのグルコマンナン、デキストランおよびグアーガムの赤外スペクトルをそれぞれ示している。これらのスペクトルは約1750の波数から約1250の波数にかけていくつかのピークを示しているが、第8図に示すようなカリシンの鋭いよく分離されたピークではない。従ってセルロース、ポリガラクトuron酸、こんにゃく植物からのグルコマンナン、デキストランあるいはグアーガムがカリシンと同様の活性をもつとは考えられない。

紙で測定し、重炭酸ナトリウム溶液（1モル濃度、フィッシャー、#S-233）を用いてpHを7±0.5に保持した。添加終了後、混合物を環境温度で、1時間攪拌し、ロータリーエバポレーターで35～40℃で減圧濃縮して容積を約80mlにした。この濃縮物を、予備洗浄した透析管（約30cm長、乾燥シリンダ直径28.0mm、スペクトレイベー・メディカル・インダストリー社、ロサンゼルス、CA#132633、2000HWカットオフ）（Spectrapor Medical Indus., Inc. Los Angeles, CA #132633, 2000 HW cutoff）に入れ、6lのエレンマイヤーフラスコ中の4℃の脱イオン水に対して、6時間ごとに水を交換しながら24時間透析した。この管を開放し内容物を12時間真空凍結乾燥して、黄味がかかった白色（オフホワイト）の粉末420mgを得た。

**B. カリシンの過ヨウ素酸ナトリウム開裂**

1.00 gのカリシン（明るい桃褐色、ロット#8B）を、500 mlの脱イオン水と1インチの攪拌棒を含む1lの丸底フラスコに入れた。この混合物を環境温度で30分間、次いで低温（4℃）で30分間攪拌して、いくらかの未溶解のカリシンを含むわずかに粘質な不均一混合物を得た。これに、10mlの脱イオン水中の過ヨウ素酸ナトリウムの溶液（99%アルドリッチケミカル社、#21、044-B；58mg、180/モノマーの平均分子量に対して5モル%）を15分かけて徐々に攪拌しながら加えた。この混合物を4℃で15時間攪拌した。溶液は均一になり、明るい桃色になった。pHをpH試験紙で測定し、pH±0.5に保持した。

**実施例 38**

カリシンのレオロジー特性の改質：

以下に議論するカリシンの改質は、カリシンの次のレオロジー特性の1つまたは2つ以上に影響を及ぼし得る：吸収、浸透性、特異性、溶解性、粘度、安定性、活性もしくは極的組織。これらの改質は、医薬品を目標とする場合に重要である。次に改質された形のカリシンの赤外スペクトルが測定された。改質された形のカリシンは改質されないカリシンと同様の生物学的活性を有するものと推論される。

**A. カリシンの過酸化水素処理**

1.00 gのカリシン（明るい桃褐色、ロット#8B）を500mlの脱イオン水と1インチの攪拌棒を有する1lの丸底フラスコに入れた。この混合物を環境温度で30分間、次いで低温（4℃）で30分間攪拌して、わずかに粘質な、いくらかの未溶解カリシンを含む不均一な混合物をつくった。この微しく攪拌された混合物に4℃において5mlの30%  $H_2O_2$  溶液（マリノクロット、ARグレード、#5240）（Hailnickrodt, AR grade, #5240）を滴々加えた。観測される変化もしくはガスの発生はなかった。この混合物を4℃で18時間静かに脱泡した。物理的な変化は認められなかった。

固体重亜硫酸ナトリウム（顆粒状、ペーカー、#1-3558）（4.588g、 $H_2O_2$  に関して1.0当量）を30mlの  $H_2O$  に溶解した。得られた透明な溶液を攪拌した反応混合物に20分間で滴々加えた。添加の間に、反応pHをpH試験

50mlのエチレングリコールを加え（ $NaIO_4$  に対して3当量）、室温で3時間攪拌して未反応の  $NaIO_4$  を分解した。固体  $NaBH_4$ （630mg、アルドリッチケミカル社、#19、807-2、98+%）を30分かけて徐々に攪拌しながら少量ずつ加えた。添加終了後、混合物を環境温度で3時間攪拌した。過剰の  $NaBH_4$  を20mlのアセトン（蒸留したもの、99.9+%HPLCグレード、アルドリッチケミカル社、#27、072-5）を用いて室温で2時間失活させた。pHは8より大きかった。そこで50%HOAc溶液（フィッシャーケミカル社、HOAc試薬グレード）を用いてpH7に調整した。アセトンを蒸発させ、溶液をロータリーエバポレーターで35℃～40℃において約80mlまで減圧濃縮した。残渣を透析管（約30cm長、乾燥シリンダ直径28.6mm、スペクトレイベー・メディカル・インダストリー社、ロサンゼルス、CA#132633、2000HWカットオフ）（これは脱イオン水で予め洗浄しておいた）に移した。この残渣を6lのエレンマイヤーフラスコ中の脱イオン水に対して6時間ごとに水を交換しながら24時間透析した。

管の内容物を取り出し、真空で12時間凍結乾燥して470mgの明るい桃色の粉末を得た。

\* 実験操作は、J.H.ボフィット“炭水化物の過ヨウ素酸酸化”アドバンスド・カーボハイドレート・ケミストリー11：1-41（1956）（J.H.Boffitt “Periodate Oxidation of Carbohydrate” Adv. Carbohydrate Chemistry 11: 1-41（1956））から部分

的に採用した。

#### C. カリシンのホスホリル化

30mlの脱イオン水中のリン酸二水素ナトリウム7水和物(マチソン・コーレマン・アンド・ベル, CB 742; 577 mg)とリン酸水素二ナトリウム7水和物(フィッシャーSci, S-373, Lot# 855049 837mg)の溶液に、1.00 gのカリシン(明るい桃褐色の粉末、ロット# 8 B)を加えた。不均一な混合物を35℃で30分間攪拌して明るい桃褐色のペーストを得た。水を、約40℃でロータリーエバポレーターを用いて減圧除去した。さらに残渣を、オイルポンプを用いて、0.1mmHg圧で3時間乾燥した。硬い固形物をガラス棒で粉末化し、1 lの丸底フラスコに入れ、次に155℃の予備加熱したオイルバスに入れた。機械的攪拌装置とテフロンパドルで攪拌されたこのサンプルの上にアルゴン(予め精製したもの)の緩やかな流れを導いた。3時間後にこの混合物を環境温度まで冷却し、50mlの脱イオン水中にスラリー化し、予め脱イオン水で洗浄した透析管(長さ30cm、乾燥シリンダーの直径28.6mm、スペクトレイベー・メディカル・インダストリーズ社、ロサンゼルスCA# 132633、2000HHカットオフ)に入れた。この混合物を6 lのエrlenmeyerフラスコ中の水に対して、低温室(4℃)において水を6時間ごとに交換しながら24時間透析した。

pHが約7の管の内容物を取り出し、真空下12時間凍結乾燥して865 mgの褐色の固体を得た。

\* 実験操作は、E.F.パッシャル“ホスフェイション・

ウィズ・インオーガニック・ホスフェイト・ソルツ”、メソッド イン カーボハイドレート ケミストリー Vol. IV, ページ 294~296, 1964; R.L.ホイッスラー編, アカデミックプレス, ニューヨーク (E.F. Paschall “Phosphatation with Inorganic Phosphate Salts”, Methods In Carbohydrate Chemistry Vol. IV, pp 294 - 296, 1964; R.L. Whistler, Ed, Academic Press, New York) から一部採用された。

別の操作についてはG.A.タウルとR.L.ホイッスラー メソッド カーボハイドレート ケミストリー, 6, 408 (1972) (G.A.Towle and R.L.Whistler, Methods Carbohydrate Chem. 6, 408 (1972))を参照されたい。

#### D. カリシンの部分メチル化\*

1.00 gのカリシン(明るい桃褐色、ロット# 8 B)を乳鉢と乳棒で粉末化し、次に75mlのアセトン(フィッシャー Sci., A-18, ロット# 858136, 蒸留したもの)に懸濁した。激しく攪拌しながら、脱イオン水にNaOHペレット(マリンクロット ARグレード7708, ロットKVHS) (Hallinckrodt AR grade, 7708, Lot KVHS)を溶解して得られた。4.4mlの30% NaOH溶液と2.2mlの硫酸ジメチル(フィッシャー)を同時に加えた。これらの試薬は、15分間隔で4等分して加えた。添加終了後、混合物を15分間攪拌し、次いでロータリーエバポレーターで減圧蒸発させた。残渣を50mlの脱イオン水中にスラリー化し、脱イオ

ン水で予め洗浄した透析管(長さ30cm乾燥シリンダーの直径28.6mmスペクトレイベー・メディカル・インダストリーズ社、ロサンゼルス, CA# 132633, 2000 HHカットオフ)に移した。残渣を6 lのエrlenmeyerフラスコ中の5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液(NaHCO<sub>3</sub> 粉末、フィッシャー、S-233, ロット# 722534)に対して6時間ごとに溶液を交換しながら24時間4℃で透析した。次にこの残渣を6 lのエrlenmeyerフラスコ中で6時間ごとに水を交換しながら4℃で脱イオン水に対して36時間透析した。

約pH7の管の内容物を取り出し、真空下で12時間凍結乾燥して明るい褐色粉末759mgを得た。

\* 実験操作はE.L.ヒルストおよびE.パーシバル“ポリリサッカライドのメチル化とメチル化生成物の分離” メソッド・イン・カーボハイドレート・ケミストリー, Vol. V, ページ 287~296, 1965; R.L.ホイッスラー編, アカデミック・プレス, ニューヨーク (E.L. Hirst and E. Percival, “Methylation of Polysaccharides and Fractionation of the Methylated Products”, Methods In Carbohydrate Chemistry, Vol. V, pp 287 ~ 296, 1965; R.L. Whistler, Ed., Academic Press, New York) から一部採用した。

また、W.N.ハワース, ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサエティー 107: 6-160 (1915). (W.N. Haworth, J.Chem. Soc. 107: 6-16 (1915))も参照されたい。

#### E. カリシンのカルボキシメチル化\*

1.00 gのカリシン(明るい桃褐色の固体、ロット# 8 B)を乳鉢と乳棒で粉末化し、次に15mlのイソプロピルアルコール(ACS試薬グレード、アルドリッチケミカル社、# 19.076-4)に懸濁した。激しく攪拌しながら、1mlの脱イオン水中の0.5gのNaOH(マリンクロットARグレード、7708, ロット# 7708KVHS)を5分間かけて滴々加え、直ちに1mlの脱イオン水中の140mlのプロム酢酸(イーストマンコダック社# 964)を加えた。この混合物をアルゴン気流下、室温で80分間攪拌した。有機溶媒をロータリーエバポレーターで30℃の浴温で減圧除去した。得られた褐色のペーストを30mlの脱イオン水で希釈し、混合物を20%酢酸水溶液(フィッシャーの水酢酸ACS 試薬グレードA-38から調製したもの)を用いてpH7まで中和した。生成物を、脱イオン水で予め洗浄した透析管(長さ30cm、乾燥シリンダーの直径28.6mm、スペクトレイベー・メディカル・インダストリーズ社、ロサンゼルス, CA# 132633、2000HHカットオフ)に移した。この生成物を低温室(4℃)で6時間ごとに水を交換しながら、6 lのエrlenmeyerフラスコ中の脱イオン水に対して24時間透析した。

管の内容物を取り出し、真空下で12時間凍結乾燥して609 mgの褐色のもろい固体を得た。

\* 実験操作は、ハンス・ビィンク, ディー・マクロモレキュラー・ヘミ 122: 271-274 (1969) (Hans Vink, Die Makromolekulare Chemie 122:

271 - 274 (1969)) から一部採用した。

#### F. カリシンの硫酸化\*

50mlのジメチルホルムアミド(ペーカーアナライズド試薬グレード, 3-9221)中の三酸化硫黄-トリメチルアミンコンプレックス(アルドリッチケミカル社, 13,587-9, 白色粉末)の0℃の懸濁液に、激しく攪拌しながら1.00gのカリシン(明るい桃褐色の固体, ロット#8B, 乳鉢と乳鉢で粉末化したもの)を一度に全部加えた。約5分後、混合物は極めて粘滞になり、攪拌することが困難になった。この混合物を攪拌しながら0℃に24時間保持し、次に50mlの脱イオン水で希釈し、予め脱イオン水で洗浄した透析管(長さ30cm, 乾燥シリンダーの直径28.6mm, スペクトレイバー・メディカル・インダストリーズ社, ロサンゼルス, CA#132633, 2000HWカットオフ)に移した。この混合物を6lのエレンマイヤーフラスコ中で10%NaHCO<sub>3</sub>水溶液(固体NaHCO<sub>3</sub>, フィッシャーSci社, ACS 証明付, S-233から調製したもの)に対して4℃で24時間透析し、次いで水を6時間ごとに交換しながら0℃~4℃の脱イオン水に対して48時間透析した。

管の内容物を取り出し、真空下12時間凍結乾燥して575mgの硬い褐色固体を得た。

\* 実験操作はR.L.ホイッスラーとH.W.スペンサー“トリエチルアミン三酸化硫黄コンプレックスによる硫酸化”メソックスインカーボハイドレートケミストリー, Vol. IV, ページ 297~298, 1964; R.L.ホイッス

ラー編, アカデミックプレス, ニューヨーク (R.L. Whistler and H.W. Spencer In "Sulfation by Triethylamine Sulfur Trioxide Complex", Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. IV, pp.297-298, 1964; R.L. Whistler, Ed., Academic Press, New York)から一部採用した。

別の操作についてはR.L.ホイッスラー, メソックスカーボハイドレートケミストリー, VI, ページ426-429, 1972 (R.L. Whistler, Methods in Carbohydrate Chemistry, VI, pp.426-429, 1972)を参照されたい。

#### G. エピクロロヒドリンによるカリシンの架橋

1.00gのカリシン(明るい桃褐色固体, ロット#8B)を乳鉢と乳鉢で粉末化し、次に200mlの脱イオン水に懸濁した。激しく攪拌しながら、エピクロロヒドリン(0.40g, アルドリッチケミカル社99%, ゴールドラベル, Cat. #24,069-9)を希釈しない液体として加え、次に2.5mlの脱イオン脱ガス水中のNaOH(マリンクロットARグレード, 1708, ロット7708KVHS 0.5g)の溶液を加えた。この混合物の60℃で80分間加熱し、次いで環境温度まで冷却した。pHを、20%酢酸水溶液(フィッシャー氷酢酸ACS試薬グレード, A-38, から調製したもの)を用いて7に調整した。この反応混合物を、予め脱イオン水で洗浄した透析管(長さ30cm, 乾燥シリンダーの直径28.6mm, スペクトレイバー・メディカル・インダストリーズ社, ロサンゼルス, CA#132633, 2000HWカットオフ)に移した。反応

混合物を4℃の低温室において6時間ごとに水を交換しながら6lのエレンマイヤーフラスコ中で脱イオン水に対して24時間透析した。

管の内容物を取り出し、真空下12時間凍結乾燥して485mgの明るい褐色の固体を得た。

#### H. ホルマリンで架橋したカリシン

1.00gのカリシン(明るい桃褐色固体, ロット#8B)を乳鉢と乳鉢で粉末化し、次に200mlの脱イオン水に懸濁した。この懸濁液に3mlの37%ホルマリン溶液(ペーカーアナライズド試薬グレード, ロット#33674, 製造#2106, 37%ホルムアルデヒド)を加え、次いで2.5mlの脱イオン水中の0.5gのNaOH(マリンクロットARグレード, 1708, ロット#7708KVHS)を加えた。この混合物を60℃で80分間激しく攪拌した。この混合物を室温まで冷却し、20%酢酸水溶液(フィッシャー氷酢酸, ACS試薬グレード, A-38, から調製したもの)を用いてpHを7に調整した。この混合物を透析管(長さ30cm乾燥シリンダー直径28.6mm, スペクトレイバー・メディカル・インダストリーズ社, ロサンゼルス, CA#132633, 2000HWカットオフ)に移した。この混合物を6時間ごとに水を交換しながら6lのエレンマイヤーフラスコ中で4℃で脱イオン水に対して透析した。

管の内容物を取り出し、真空下12時間凍結乾燥して518mgの白/褐色のもろい固体を得た。

#### 実施例 39

傷処理用の普通の局所剤の比較:

培養ヒト線維芽細胞に対する細胞毒性

ヒト線維芽細胞の培養物を用いて、傷口の洗浄に普通に用いられているいくつかの局所剤の細胞毒性を測定した。この目的は、カリシンを含有する創傷用のゲルを、異なる作用機作を有するいくつかの標準的な清浄剤と比較することであった。これらの標準清浄剤は、表皮のバリアーの裂けに続く細菌性損傷および組織の崩壊を軽減するために設計されている。放射性ラベルしたクロムの放出とトリバンブルー染料の取り込みを用いて細胞毒性を測定した。培養した線維芽細胞は0.5%のような高い濃度のカリシンによって損傷を受けなかった。対照的にポビドン(Povidone)-ヨウ素(ベタジン)、トリプシンとペルーバルサム(グラニウレックス)、クロルヘキシジン(ヒビクレンス)、または過酸化水素は、ラベルした細胞から<sup>51</sup>Crを放出した。ベタジン、ヒビクレンスおよびグラニウレックスはまた、トリバンブルーによる染色を強化したが、カリシンによる処置はこれを強化しなかった。これらの試験管内試験によれば、カリシンは皮膚用ならびに創傷治療用として安全であると思われる。

細胞培養。ヒトの皮膚線維芽細胞が新生包皮の外植体からおよび帝王切開の際に下腹部から採取された成人の皮膚のサンプルから生育された。この組織は、脂肪と皮下結合組織を取り除かれ、2mm立方の粒子に切り刻まれ、小さな

(25 ml) 培養フラスコに入れられた。5%牛胎児血清(ハゼルトン)(Hazelton) 200mMグルタミンおよび1%抗生物質を補った最小基本培地(HEH)(インランド・ラボラトリーズ)からなる培地を加え、培養物を5%CO<sub>2</sub>雰囲気下37℃に保持した。

ケラチン生成細胞と繊維芽細胞の混合物が、数日のうちにこの組織の縁部から生長した。ケラチン生成細胞は分割できなかったが、繊維芽細胞は16~21日以内に増殖して特徴的な渦巻状のパターンを有する細長い細胞の単層を形成した。すべての培養物は、使用前に少なくとも3回継代培養され、10~15回継代まで使用された。

局所剤。試験管内の系における細胞毒性を測定するために、嚢や尿すれの処置に普通に使用されているいくつかの製品を、ヒト繊維芽細胞の標準化された培養物に直接加えた。ポビドン-沃素溶液(ベタジン)、過酸化水素、グラニュレックスおよびクロロヘキシジン(ヒビクレンス)は、異なる作用機作を持つ普通に使用されている消毒剤である。これらの化合物(0.001~0.5%)を、培養された繊維芽細胞に対する細胞毒性効果についてカリシンと比較した。

細胞の処理。バックス-EDTA(Pucks-EDTA)溶液に短く曝露(5~10分)した後、0.25%トリプシンを用いて単一の細胞単層から細胞を分離した。懸濁した細胞を遠心分離してペレットにし、一度新鮮な媒体で洗浄した後、グルタミン、抗生物質および1%牛胎児血清を補ったHEHに再懸濁した。細胞の数を電子細胞計数器(コルター・エレ

クトロニクス、ハイアリー、フロリダ)(Coulter Electronics, Hialeah, FL)で測定し、個々の実験に必要なように希釈して調整した。この細胞を<sup>51</sup>Cr(1μCi/μl)でラベルし、24個の窪みをもつ多孔プレートに1つの窪み当たり10<sup>5</sup>の密度で入れた。このプレートをインキュベーターに18時間戻した。各実験の開始時に放射性媒体を吸引して除去し、各窪みを新鮮なHEH+1%牛胎児血清を用いて4回洗った。HEH単独もしくは試験生成物の種々の希釈物を含むHEHを複製窪みに加え、プレートをさらに1~30分間インキュベートした。インキュベーション期間の最後に培地を染め、放出された放射能の測定のために保存した。各窪み内の細胞を、0.1M NaOHを用いた0.5mlのトリトンX-100(1%)の添加により溶菌し、溶菌物のサンプルを放射能測定用に取り出した。

細胞毒性の測定。細胞毒性は、種々の異なる化学物質を用いてインキュベートしたラベルした繊維芽細胞からの放射性クロムの放出によって定量化された。放出率は、培地の上面層中の放射能の量を培地と細胞の両者の放射能の合計で割ることによって計算された。

細胞毒性の別の測定は、トリパンブルーによって染色することにより行われた。細胞をそれぞれの試験試薬を用いて15分間インキュベートした。トリパンブルー(1%)をそれぞれの窪みに加え、インキュベーションをさらに5分間継続した。このサンプルを光学顕微鏡で検査し、ニコン逆相顕微鏡に付属しているニコン35mmカメラで撮影した。

細胞毒性は、対照(未処理)細胞に対するトリパンブルーで染色された細胞の百分率を決定することにより評価した。この測定の結果は以下の表23に示されている。

表 23

トリパンブルー染色法によって  
測定された局所剤の細胞毒性  
インキュベ

製 品	濃 度	シ ョ ン 時 間	染色百分率
ベ タ ジ ン	0.01 %	15分	100
ヒビクレンス	0.01 "	15分	100
グラニュレックス	0.01 "	15分	100
カ リ シ ン	0.01 "	15分	5
培 地 単 独	—	15分	1

それぞれの試薬もしくは培地単独を用いて培養細胞を15分間インキュベートし、トリパンブルー(1%)を施し、5分後に染色された核の数を数え、視野内の全細胞核の百分率として表わした。

細胞損傷の時間経過。局所剤による直接的な細胞損傷は迅速に起こり、細胞からの<sup>51</sup>Crの放出の増大によって認められた。培地単独もしくは10%牛胎児血清で処理された培養繊維芽細胞は5~80分間のインキュベーションの間に全クロムラベルの5%以下を放出した。対照的に0.05%

ベタジン、グラニュレックスまたはヒビクレンス処理された細胞は5分以内に全ラベルの55~62%を放出した。10分または15分のインキュベーションは、これらの試薬のすべてについて放出される量をわずかに大きくしたが、これより長いインキュベーション(30分間)は放射能の放出を増加することはなかった。カリシン(0.05%)で処理された細胞は、30分間のような長いインキュベーションの間に全ラベルの5%以下を放出した(第30図)。

細胞の損傷に対する濃度の影響。種々の試薬を0.005~0.05%の範囲の濃度で細胞毒性について試験した。第31図に示すように、グラニュレックスとヒビクレンス(0.01%)は、繊維芽細胞から全クロムラベルの25%および75%を放出した。最も低濃度のベタジン(0.005%および0.01%)による放出は、培地単独による放出より小さくなかった。しかし、0.015%ベタジンに曝露された細胞は、その全放射能の70%より多くを放出した。0.5%までの濃度のカリシンは、培地単独より多く放出しなかった。

トリパンブルー染色を用いて細胞の損傷を調べた時に、同様の結果が得られた。表に示すように、0.01%ベタジン、ヒビクレンスまたはグラニュレックスを用いた15分間インキュベーションは、細胞の100%を殺した。同じ濃度のカリシンを用いたインキュベーションは、僅かに5%を殺した。0.01%濃度の過酸化水素は、形態における変化によって判断すると、この細胞をひどく損傷した。しかしこの試験によるトリパンブルー染色は、その脱色効果の故

## 表 24 傷の治療の経過

日	傷の面積	
	(平方インチ)	治癒の百分率
1	1.24	0.00
28	0.51	58.87
77	0.29	76.61
83	0.12	90.32
97	0.00	100.00

に測定することができなかった。

併用試験の効果。いくつかの実験において、カリシンは他の局所用剤の添加前に樹乳芽細胞培養物に加えられた。培養地単独および10%牛胎児血清を含む培養地中で、その細胞毒性効果を測定した。第32図は、カリシン単独は細胞を損傷しないけれども、それは15分間のインキュベーション中ヒビクレンスまたはベタジンにより放出された $^{51}\text{Cr}$ の量を変化させなかったことを示す。同様に、培養培養地中に牛胎児血清が含まれていてもこれらの試薬の細胞毒性効果を変えなかった。

## 実施例 40

83才の女性の患者、TB、は左足の側縁部に直径23mmの潰瘍を作った。この潰瘍は、数ヶ月間癒えられ、いくつかの治療処方に対して応答しなかった。

この傷を、1日4回の治療スケジュールを用いて実施例3の生成物および実施例7の生成物で処置した。それぞれの傷を、実施例3の生成物を用いて15分間浸漬した。過剰の生成物が乾燥滅菌4×4ガーゼを用いて傷から吸収された。

次に実施例7の生成物を、この傷を覆いかつ包帯を交換する間に傷が脱水するのを防止するのに十分な量で適用した。

傷の治療の経過を、間隔をおいて写真を撮り、傷欠陥の面積を測定することによって測定した。傷のふさがる経過を表24に示す。

表皮の傷は、12週間で実質的にふさがり、14週間で完全にふさがった。

## 実施例 41

32才の患者は“多年の間”潰瘍性大腸炎の歴史を持っていた。持続的な症状の発現の間、彼女は40mgのプレドニソン(prednisone)、3gのアサルフィジン(Asulfidine)、50mgの6-メルカプトプリンおよびフラジル(Flagyl)からなる日々の処方に対して応答しなかった。彼女は腹部の痛みを継続して有し、1日に4〜8回血便があった。彼女は点滴を受けた。内視鏡の診断では、穏やかな肝臓ないし横断潰瘍を伴う重い進行する結腸潰瘍を示した。この患者は、彼女の他の医薬に加えて1日4回50mgのカリシンを投与され、家に帰された。1週間で彼女の症状は実質になくなった。腹部はさわるとわずかに痛み、内視鏡検査では治癒したわずかに充血した粘膜が見られた。この患者は他の薬物

療法を徐々に取り払われ、病状は改善を続けた。この患者は現在この時間において単独の薬物としてカリシンを継続している。身体検査および症状は、全て正常であると記録されている。

潰瘍性大腸炎とクローン病(Crohn's disease)に同様の応答を示す5つの別のケースが認められた。一人の患者は、カリシンのカプセルを切らした。4週間で軽い症状が再発し始めた(穏やかな腹部の不快感を伴った排便が増えた。)そして彼女は薬物の投与を再開した。3日で彼女は全休として正常な排便症状に戻った。

## 実施例 42

多数のエイズの患者が、毒性または副作用を伴うことなく長期間カリシンの大量投与を受けた。これらのエイズ患者には臨床症状の軽減および消滅ならびに感染の機会減少を伴ってT-4およびT-8リンパ球の比の上昇およびT-4の絶対数の上昇が認められた。カリシンは患者において抗ウイルスもしくは免疫調節効果を有することが示唆される。

これらの患者のリンパ球に対する刺激が観察された。このことはカリシンの免疫調節に関与しているかもしれないことを示唆する。

## 実施例 43

Ticドルロー(douleur)すなわち第5脳神経の神経痛は、1つまたは2つ以上の三叉神経の枝の激しい我慢できない痛みの発作によって特徴付けられる。この痛みは一

般に一過性であり、発作は顔のある部分、いわゆるトリガーゾーンに触れることによって急発することがある。

この痛い病気の原因および治療は、知られていない。この疾患を治療するためのいくつかの試みは、少ししかもしくは全く成功していない。種々の処置には、鎮痛剤、フェニトイン、噴霧剤を通過する関与する神経分枝の周辺摘出およびガセリアンガングリオンに98%アルコールを注射することが含まれている。

ガングリオンに近接する神経の感覚の根元を切断するというより過激な処置は、切断された神経が支配する領域における感覚を患者から永久に取り去るものである。もう1つの最近の治療の試みは、カルバマゼピンとフェノリオフエンシレートの使用によるものである。しかし、これらの注射は、痛みの麻痺および重大な副作用により面倒なことになりうる。

これまでに提案された治療法は、いずれも好ましいものではない。

43才の女性がTicドルローにかかっていると診断された。痛みが襲う部分は、右側の三叉神経の第1および第3部分を含んでいた。

この患者は、右側の髪をブラッシングあるいは髪でとくと痛みが起こった。彼女はジアゼパム(バリウム)(Valium)、抗ヒスタミン剤、鎮痛剤、プロプラノロール塩酸塩(インデラル)(Inderal)およびフェノバルビタールで治療したがうまくいかなかった。この患者は、この病

気がかかってから痛みのない日は全くなかったと述べていた。提案された治療法は、実施例2の製品を毎日1〜2オンス、3ヶ月間服用するというものであった。この期間の後、この治療法が評価された。

患者の痛みは、治療を開始してから2週間以内に実質的になくなった。彼女は数週間気分がよいと語った。しかし続いて彼女は2週間の旅行に出かけ、その間実施例2の生成物を服用しなかった。この旅行中に症状と痛みが再び襲った。しかし彼女がこの薬物療法を再開すると、痛みは数日のうちに消えた。次の数週間、彼女は再び気分がよかった。

このジュースを毎日6ヶ月以上にわたり障害を伴うことなく飲んだ後、彼女は痛みを覚えることなく髪をブラッシングし、とかすことができると報告している。彼女の様子は改善され、彼女は以前にはなかったほど気分がよいと言っている。

#### 実施例 44

##### カリシンの収率に及ぼすアルコール濃度の影響

操 作：

ヒルトップの葉(15.9ポンド)を洗ひ、フィレット化し、ワリングブレンダーで粉砕し、次いで8層の棉布で濾過した。次にこのゲルを4個の11クオートステンレススチール製パンに移し、冷たいUSP グレードのエチルアルコールをそれぞれに容量比で2:1, 3:1, 4:1, および5:1の割合で加えた。その量は以下のように要約すること

比(エタノール : アロエゲル)	収量(g)	収率%(カリシン g/ゲルg)
2:1	.0518	.010
3:1	.3847	.077
4:1	1.945	.116
5:1	.6675	.134

さらにエチルアルコールを加えた後、2:1の上澄み液はさらに178 時のカリシンを生成した。1 晩沈降させるだけにより、3:1 および 4:1 の比の上澄み液は、それぞれさらに89 時のおよび 105 時を生成した。5:1 の比は、最初に単離の後、ほとんど析出を生成しなかった。従って再採集はしなかった。

2:1 の比からの2回目の析出(3:1)の場合に、凍結乾燥する前に5〜10 mlの水を用いて遠心バケツを濯いだ。これは、他のサンプルが生成した密度の高い灰色のカリシンサンプルとは著しく異なる低密度の白色のふわふわしたカリシンを生成した。

#### ま と め

カリシンは、カリシンが約80%のマンノースから構成されていることを示す実施例13によって証明されるように、主としてマンナンである。マンナンのマンノースモノマーは、実施例14によって証明されるように主としてβ(1→4)結合によって連結されている。元素分析、IR, NMR およびアセチル基分析の結果は、カリシンにはO-アセチル、

とができる：

比(エタノール : アロエゲル)	ゲルの量	エチル アルコールの量
2:1	500ml	1000ml
3:1	500ml	1500ml
4:1	1670ml	6680ml
5:1	500ml	2500ml

析出物を4時間沈降させ、次いで残存するアルコール-ゲル溶液を注意深くデカントし、別の容器に置いた。この析出物をIECセントラ-7遠心分離機を用いて2800rpmで10分間遠心分離し、アルコールで洗浄し、次いで同じ条件で再び遠心分離した。ペレットを600 mlのジャーに移し、液体窒素で凍結し、1 晩凍結乾燥した。

2:1の比からの上澄み液に追加のアルコールを加え、室温で1 晩沈降させた。残存する上澄み液も室温で放置し1 晩沈降させた。

翌日に、追加のアルコールで析出された2:1の比からのペレットを除き、先に述べたように上澄み液から析出物を集めた。この場合、ペレットを凍結乾燥ジャーに移す際に約5〜10mlの水を加えた。

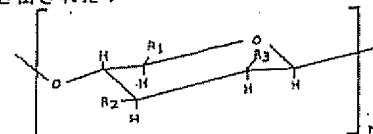
結 果：

はじめの4時間のアルコール析出の結果は、次のように要約することができる：

N-アセチルおよびカルボキシレート官能基が存在することを示している。

析出に先立ってカリシンを処理する時間が、カリシンの総体的な品質ならびに収量にとって重要であることが示された。カリシンが析出される前にゲルが放置される時間が長いほど、ゲル中の酵素がカリシンに作用する時間が長くなり、官能基ならびにグリコシド結合(β(1→4))を開裂し、その結果、その活性を減少ないし消失させる。

上記実験の結果ならびに証拠のすべてから、次の構造が導き出された：



上記式中R1 = -CH<sub>2</sub>OH, -COO<sup>-</sup>, または -CH<sub>2</sub>OOCH<sub>3</sub> ;

R2 = -OH, -OOCHCH<sub>3</sub>, または -NHCOCH<sub>3</sub> ;

R3 = -OH, -OOCHCH<sub>3</sub>, または -NHCOCH<sub>3</sub> ;

および

n = 2 ~ 約50,000.

主にマンナンの鎖は、他の置換された単純な5炭糖もしくは6炭糖モノマーを含むことができる。

カリシンの製造、単離および特徴付けは、新規かつ非自明の操作および手法を含んでいた。種々の理由で正しくなく、又は不正確であったこの技術分野における他の従来の仕事によって証明されるように、カリシンは、アロエ中の

活性物質を単離し特徴付けるための他人のこれまでの試みからは非自明であり、新規である。

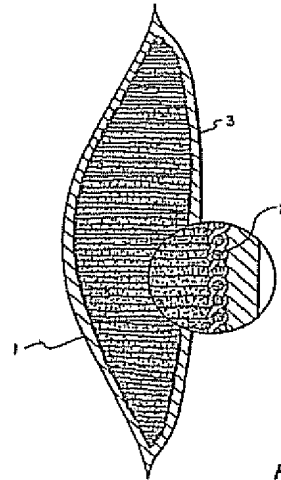


FIG. 1

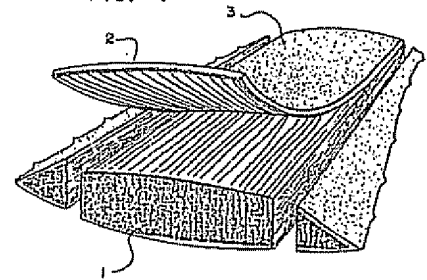


FIG. 2

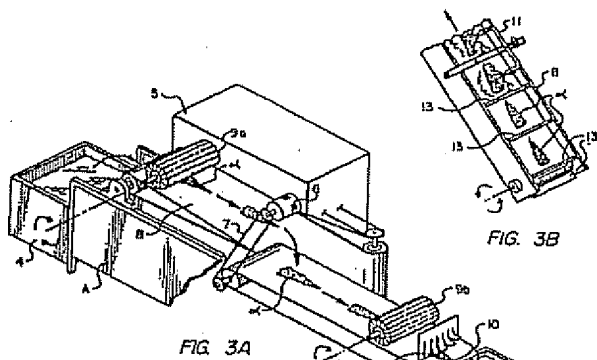


FIG. 3A

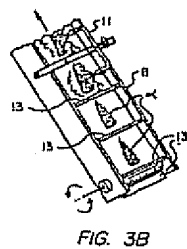


FIG. 3B

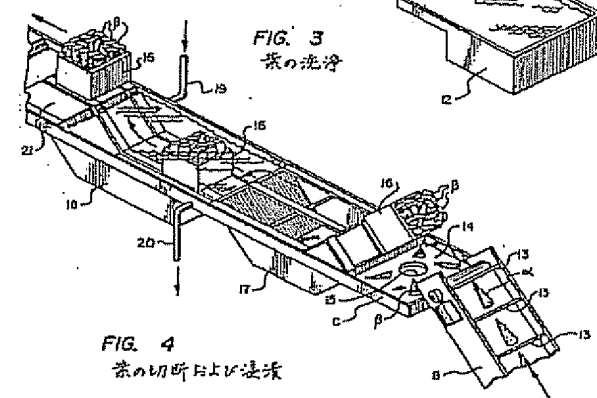


FIG. 3  
茶の洗浄

FIG. 4  
茶の切断および洗浄

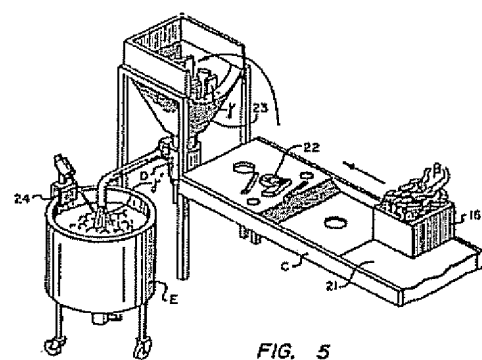


FIG. 5  
フィルタおよび粗砕物の脱離

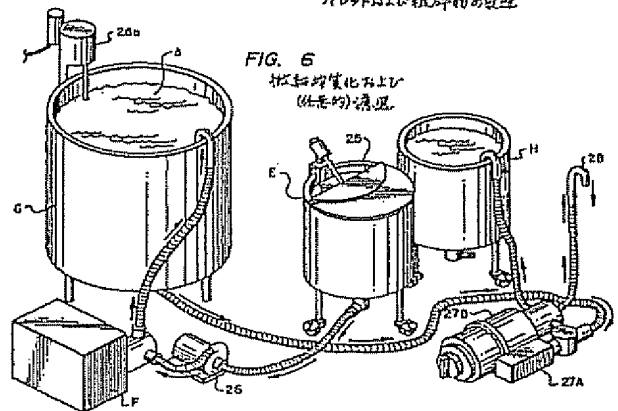


FIG. 6  
粗砕物の化学処理  
(化学的) 装置

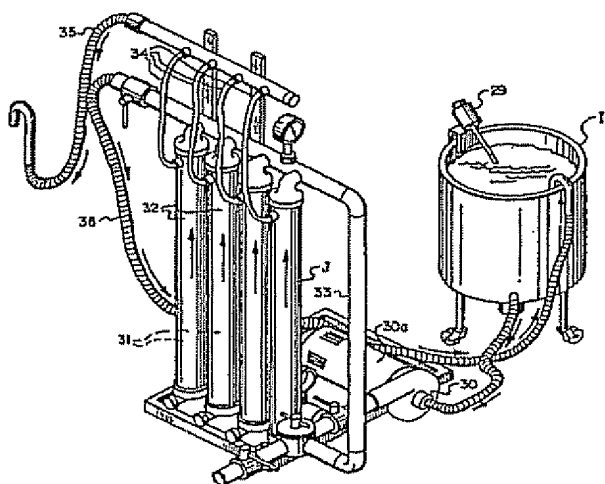
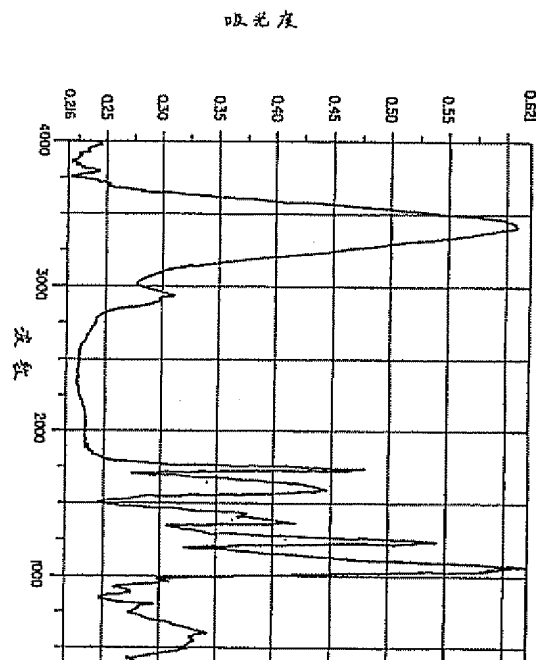


FIG. 7  
透析装置

サンプル: ジェラチン  
溶媒: KBR 粉末中 1%

FIG. 8

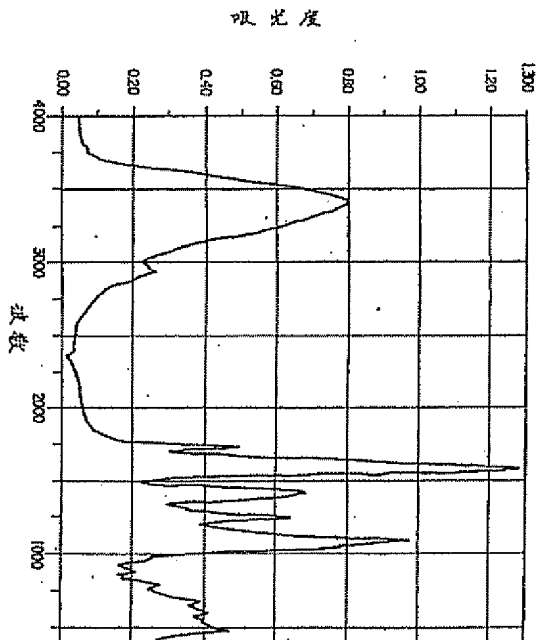
サンプル: 22  
濃度: 4 cm<sup>-1</sup>



サンプル: ジェラチン 11B  
溶媒: KBR 中粉末

FIG. 9

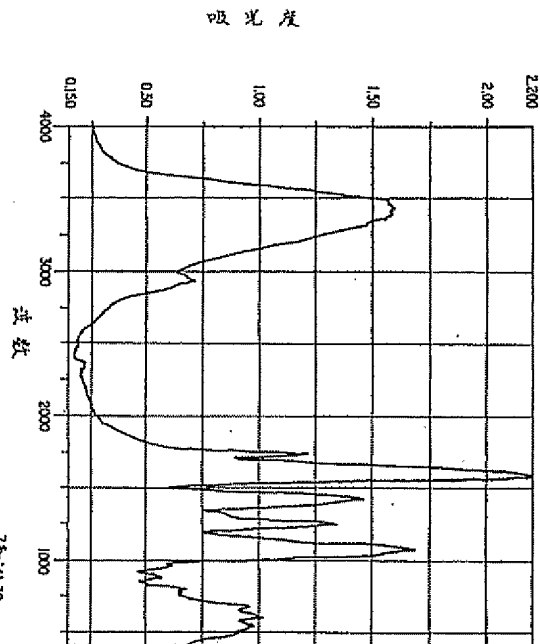
サンプル: 30  
濃度: 4 cm<sup>-1</sup>



サンプル: ジェラチン 3B  
溶媒: KBR 中粉末

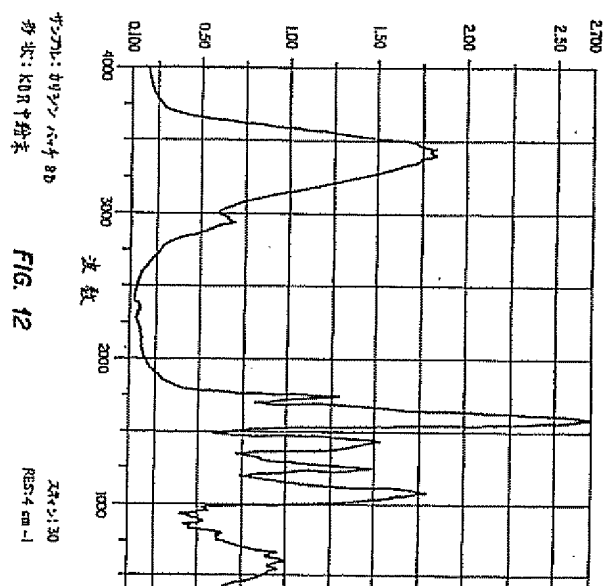
FIG. 10

サンプル: 30  
濃度: 4 cm<sup>-1</sup>

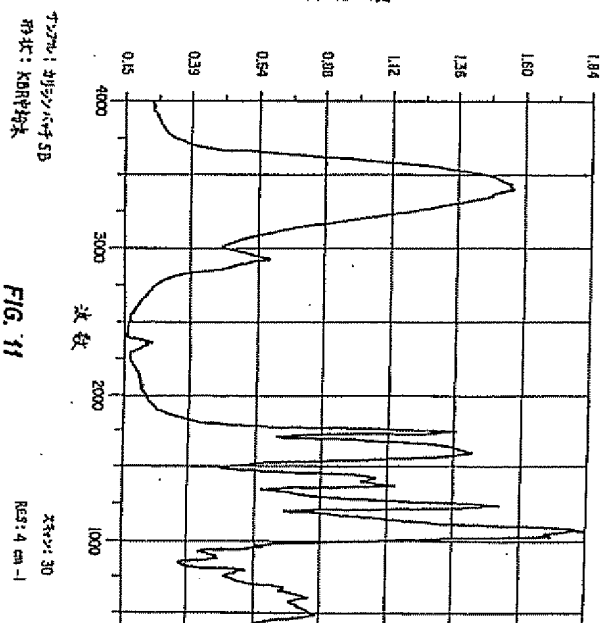




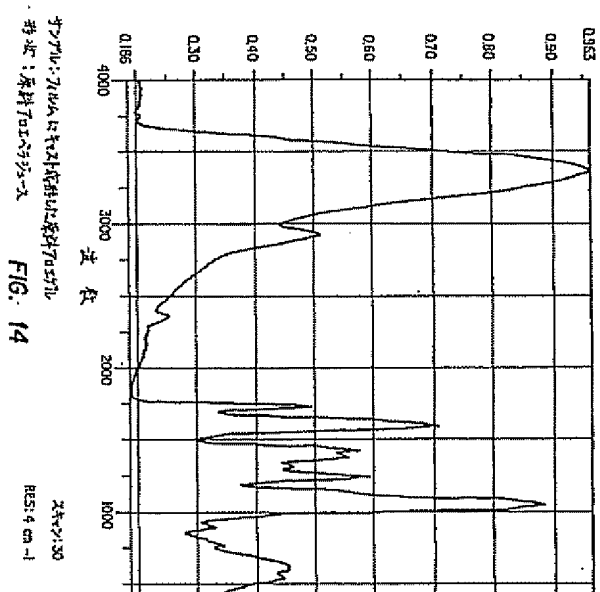
吸光度



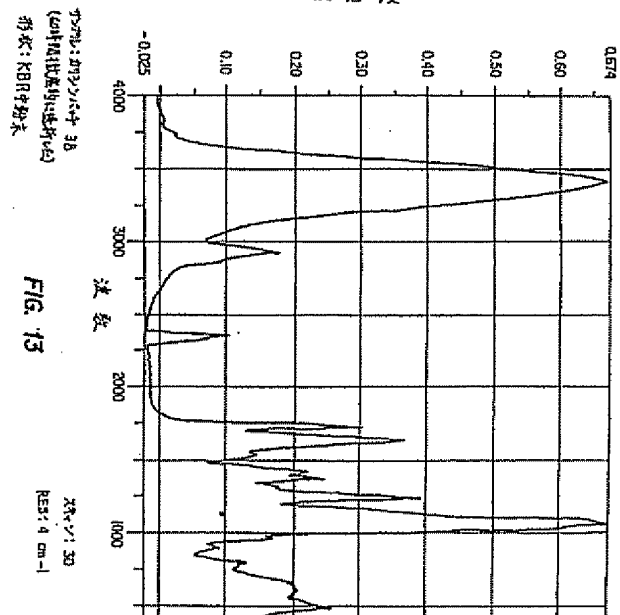
吸光度



吸光度



吸光度



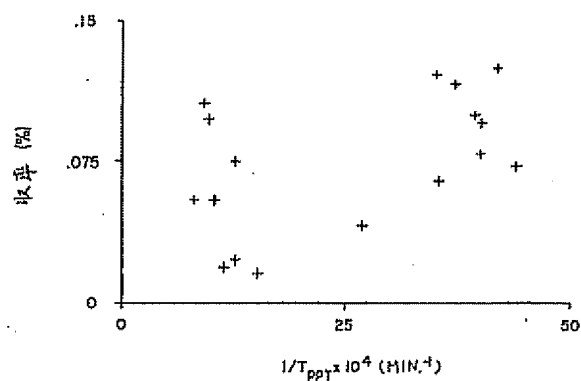
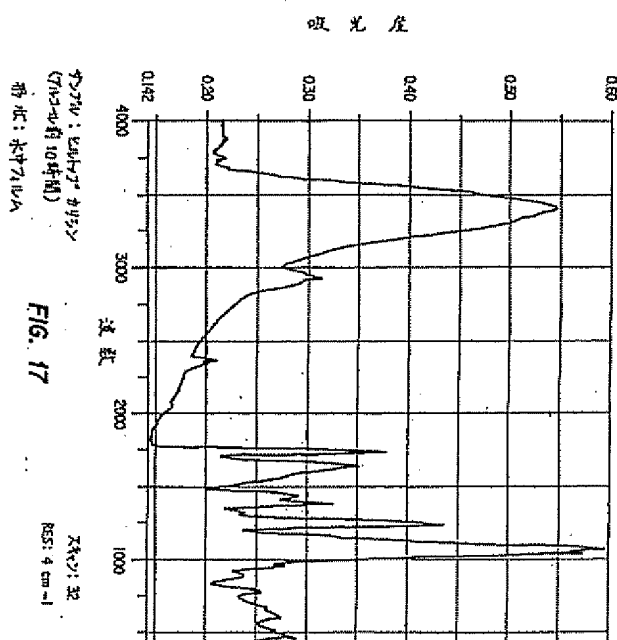
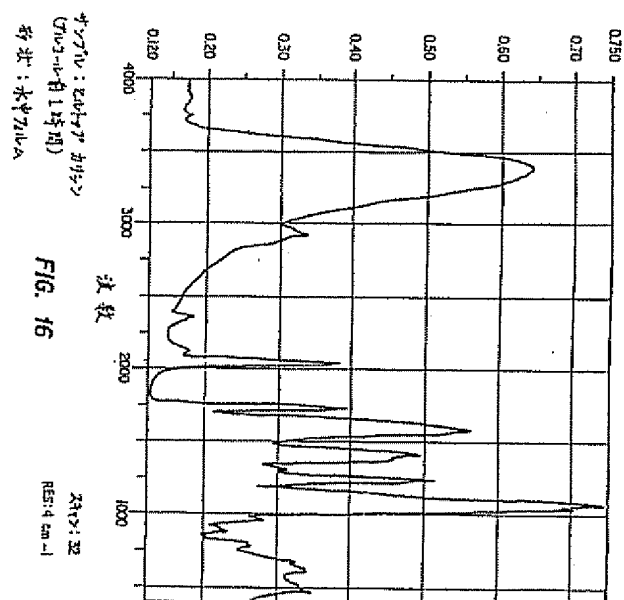
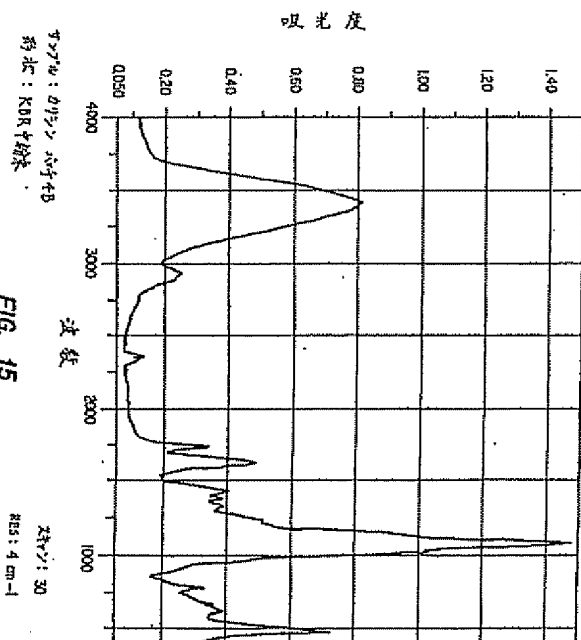
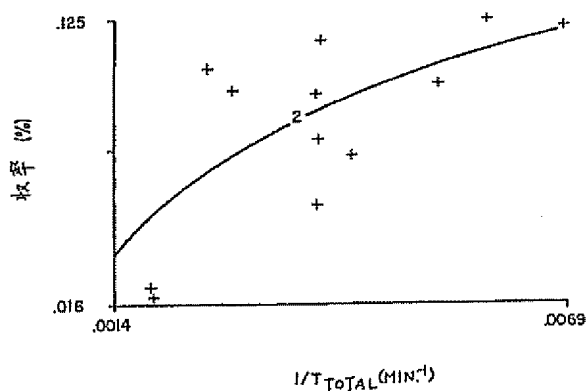
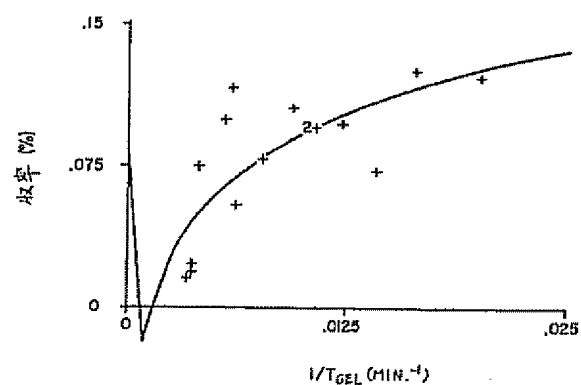


FIG. 18

アルコール中のゲルの時間(析出プロセス)の  
速度に対するカリシの収率をプロットした



最もよく適合する式: % 収率 =  $0.053 \log(1/T_{TOTAL}) + 0.385$   
 $R^2 = 0.550$



最もよく適合する式: % 収率 =  $0.048 \log(1/T_{GEL}) + 0.314$   
 $R^2 = 0.565$

FIG. 19

析出前の全処理時間の逆数に対する  
 カリシンの収率をプロットしたもの

FIG. 20

均質化および濾過の時間の逆数に対して  
 カリシンの収率をプロットしたもの

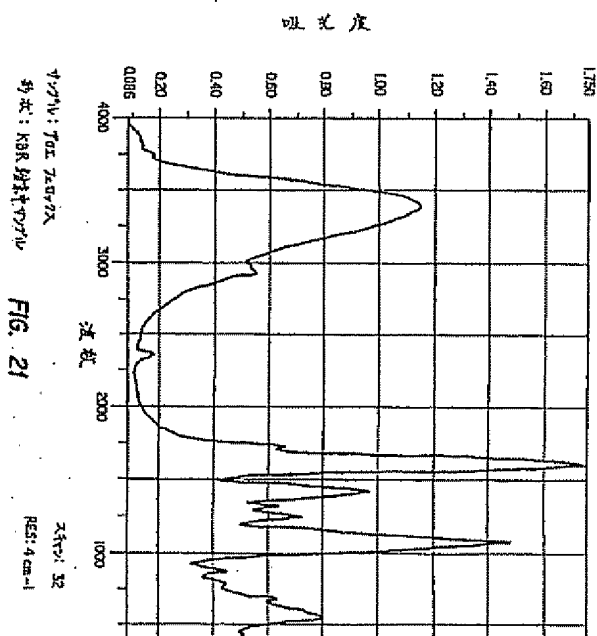


FIG. 21

サンプル: TOL 7A-B-7X  
 形状: KBR 錠状ペレット

スキャン: 32  
 RES: 4  $cm^{-1}$

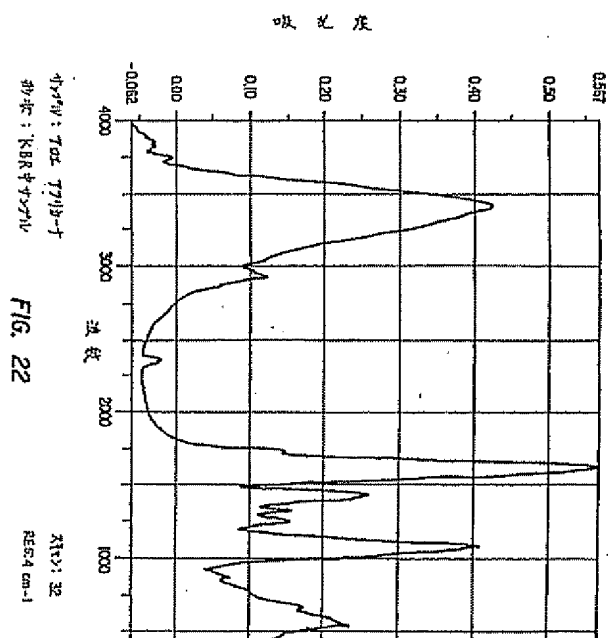
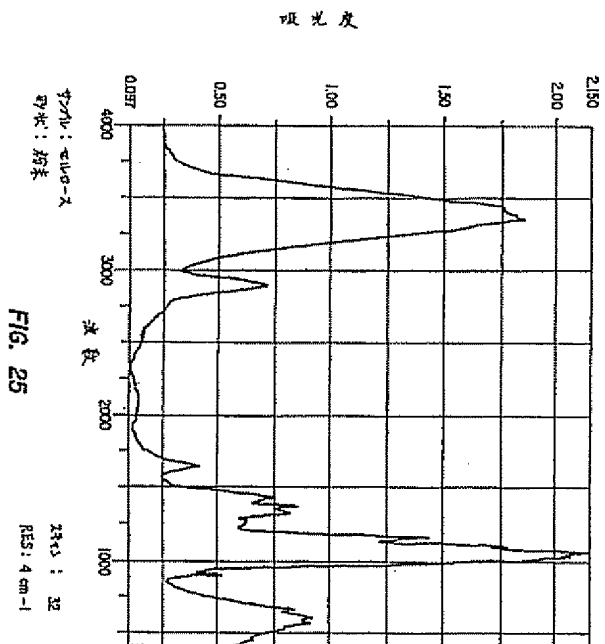
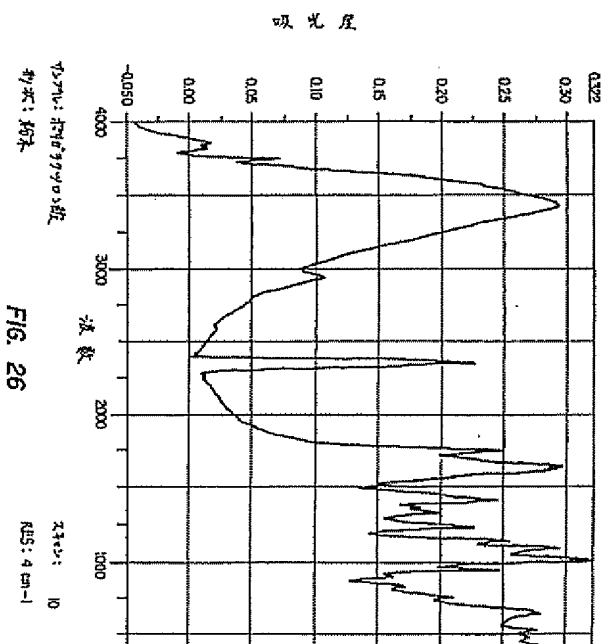
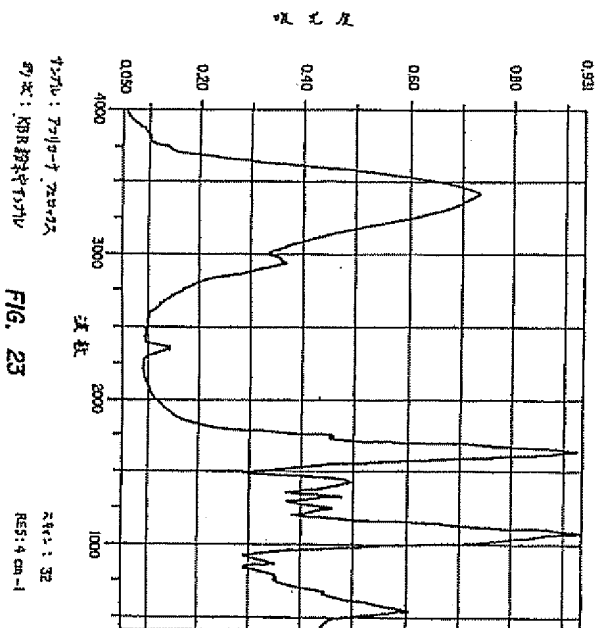
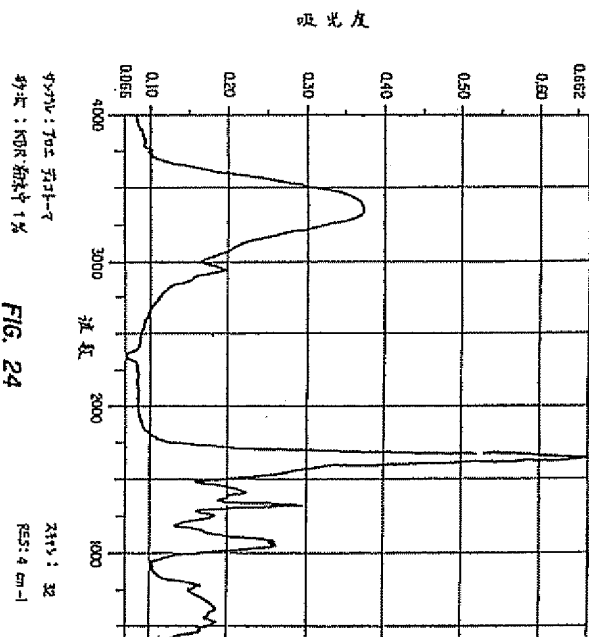


FIG. 22

サンプル: TOL 7A-B-7  
 形状: KBR 錠状ペレット

スキャン: 32  
 RES: 4  $cm^{-1}$



吸光度

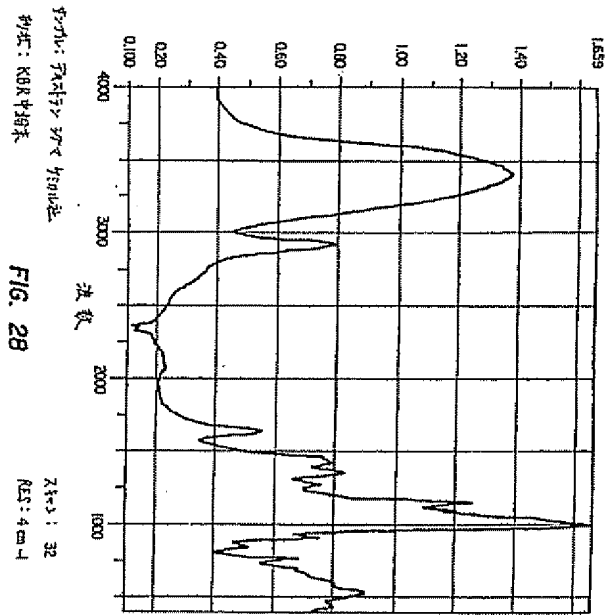


FIG. 28

波数: 32  
厚さ: 4 cm-1

吸光度

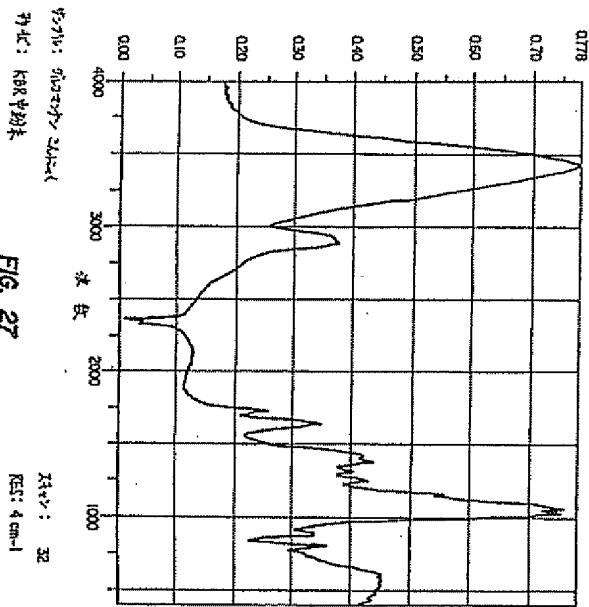


FIG. 27

波数: 32  
厚さ: 4 cm-1

吸光度

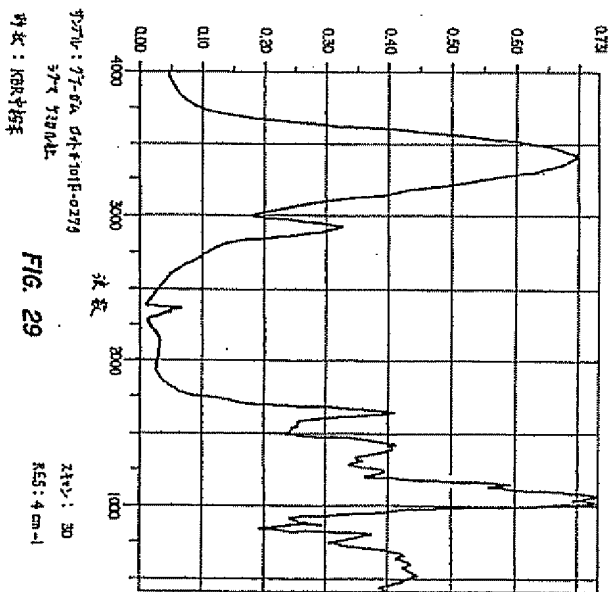


FIG. 29

波数: 30  
厚さ: 4 cm-1

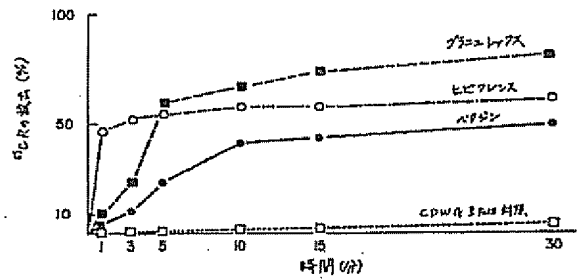


FIG. 30

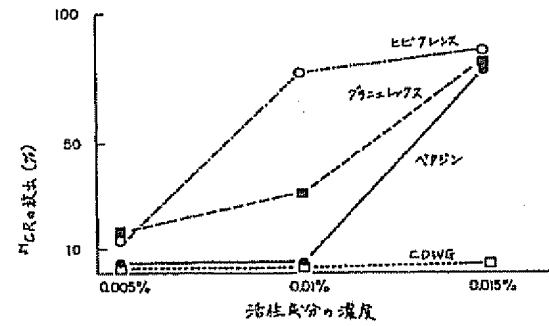
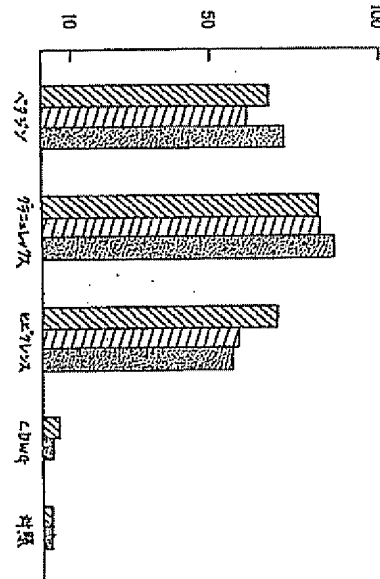


FIG. 31



INVESTIGATION REPORT NO. PCT/USA0/01335

[illegible]

Form PC7, 12A, 7/11 | Printed on Recycled Paper | 100-0000

SECRET//NOFORN PCT/US86/01335

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET		REF ID: A66394
A.	'05, A. 4,178,372 (CONTS) 11 December 1979 see entire document	1-16
X	N. Varagel, Bulletin issued 1982, (South Hackensack, NJ), Madis Laboratories, see page 9.	4-16

---

☐ **OBSERVATIONS WHICH CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNREACHABLE \*\***

The International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(b) for the following reason(s):

☐ Claims covering \_\_\_\_\_, because they relate to subject matter not claimed by the applicant, namely:

☐ Claims covering \_\_\_\_\_, because they relate to the prior art of the International Search Report, consisting of:

---

☐ **OBSERVATIONS WHICH STATE THE LACK OF INVENTION IS LACKING \*\***

The International Searching Authority is not a legally competent authority to determine the lack of inventive step.

---

☐ As an applicant's national application was never published, the International Searching Authority is not in a position to make observations on the inventive step.

☐ As any claim of the present document is not supported by the applicant, the International Searching Authority is not in a position to make observations on the inventive step.

☐ The applicant's national application was never published by the applicant, and the International Searching Authority is not in a position to make observations on the inventive step.

☐ As no national application was published, the International Searching Authority is not in a position to make observations on the inventive step.

Remarks on Form 100

☐ The International Searching Authority is not a legally competent authority to determine the lack of inventive step.

☐ The International Searching Authority is not a legally competent authority to determine the lack of inventive step.

第1頁の続き

⑨Int.Cl.‘

識別記号

庁内整理番号

A 61 K 35/78

8413-4C

優先権主張

⑩1985年7月12日⑬米国(U S)⑪754859

⑫1985年12月17日⑬米国(U S)⑪810025

⑭1986年6月5日⑬米国(U S)⑪869261